

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 janvier 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/06441 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **C12M 3/06**

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/02358

(22) Date de dépôt international : 19 juillet 2001 (19.07.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00115568.8 19 juillet 2000 (19.07.2000) EP

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **GEM-CELL LTD (SOCIETE DE DROIT IRLANDAIS**
[IE/IE]; Clifton House, Lower Fitzwilliam Street, Dublin
2 (IE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **VENTIL-LARD, Jérôme** [FR/FR]; 4, mai Gaston Plante, F-77185 Lognes (FR). **HERODIN, Francis** [FR/FR]; 78, impasse du Bois Cornu F-38920 Crolles (FR). **CATERINI, Richard** [FR/FR]; "Le May", 73, route de Trève de Gain, F-69530 Orléans (FR).

(74) Mandataire : **GAUCHERAND, Michel**; IXAS Conseil, 15, rue Emile Zola, F-69002 Lyon (FR).

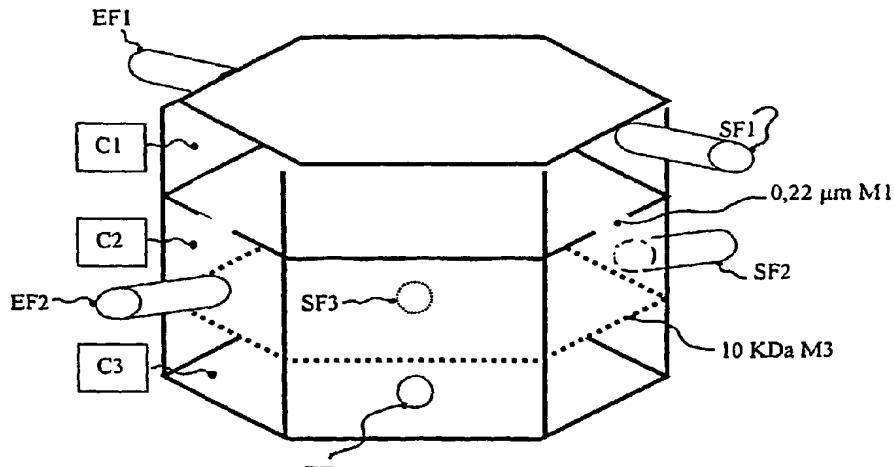
(81) États désignés (national) : AE, AU, BR, CA, CN, CU, CZ, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, US, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: CELL CULTURE CHAMBER AND Bioreactor FOR EXTRACORPOREAL CULTURE OF ANIMAL CELLS

(54) Titre : CHAMBRE DE CULTURE CELLULAIRE ET BIORÉACTEUR POUR LA CULTURE EXTRACORPORELLE DE CELLULES ANIMALES



EF... FLOW INLET PORT

C... MODULE

SF... FLOW ONTLET PORT

WO 02/06441 A1

(57) Abstract: The invention concerns a cell culture chamber having at least two planar filtering membranes with different cut-off, delimited by an envelope with axis of symmetry formed by an outer lateral wall, two end walls and inlet ports and outlet ports for dynamic liquid media, and a bioreactor containing the culture chamber for extracorporeal culture of animal cells.

[Suite sur la page suivante]

**Publiée :**

— *avec rapport de recherche internationale*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : L'invention concerne une chambre de culture cellulaire à au moins deux membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent, délimitée par une enveloppe à axe de symétrie qui est formée d'une paroi latérale externe, de deux parois d'extrémités et d'entrées et de sorties de milieux liquides dynamiques, ainsi qu'un bioréacteur contenant ladite chambre de culture pour la culture extracorporelle de cellules animales.

Chambre de culture cellulaire et bioréacteur pour la
culture extracorporelle de cellules animales

Domaine de l'invention

5

La présente invention concerne une chambre de culture cellulaire et un bioréacteur la contenant pour la culture extracorporelle de cellules animales.

10 L'invention concerne plus particulièrement une chambre de culture cellulaire à au moins deux membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent délimitée par une enveloppe à axe de symétrie et un bioréacteur qui permet la culture de cellules animales dans ladite chambre de culture tout en régulant et contrôlant l'environnement 15 dans lequel les cellules sont cultivées.

La chambre de culture cellulaire et le bioréacteur de l'invention pour la culture extracorporelle de cellules animales permettent la culture de cellules animales dans des conditions stériles.

20 L'invention s'applique à la production de cellules animales comme par exemple les cellules hématopoïétiques, les cellules hépatiques, les cellules de la peau (appelées les kératinocytes), les cellules de pancréas, les cellules nerveuses organisées ou non en structure tissulaire dans 25 un but thérapeutique.

Etat de la technique

La transplantation d'organe, de tissus ou de cellules représentant une avancée technologique médicale 30 considérable, un vif intérêt économique s'est par conséquent développé pour la réalisation de bioréacteurs destinés à la culture de cellules animales dans un but thérapeutique soit en greffant lesdites cellules, soit en les utilisant dans des dispositifs externes interfacés 35 avec le patient comme moyens palliatifs à une déficience organique.

Un inconvénient majeur des bioréacteurs actuels destinés à la culture des cellules eucaryotes réside dans le transfert de masse, c'est-à-dire le transfert de masse 40 des nutriments et de l'oxygène dissout jusqu'aux cellules

- 2 -

eucaryotes, du fait que ces cellules sont fragiles et qu'elles sont détruites par le stress mécanique généré par l'agitation du milieu pour l'aérer.

Le brevet américain n° 6,048,721 décrit un bioréacteur pour la croissance et le maintien ex vivo de cellules mammifères. Dans ce bioréacteur, la chambre de culture discoïdale est délimitée par un lit planaire de cellules et une membrane perméable aux gaz et imperméable au liquide. Le milieu nourricier perfusé dans le compartiment inférieur du bioréacteur se diffuse radialement et l'air insufflé dans le compartiment supérieur oxygène le milieu. Selon le mode de fonctionnement de ce bioréacteur, le milieu chargé des déchets générés par la culture des cellules part à l'égout. La récupération des cellules après culture se fait selon un traitement enzymatique. Dans ce type de dispositif, l'épaisseur de la chambre de culture risque d'induire un gradient de pression partielle en oxygène qui est peu adapté à une bonne viabilité cellulaire.

L'inconvénient des bioréacteurs connus de l'art antérieur et destinés à la culture des cellules eucaryotes réside dans le fait que ces bioréacteurs fonctionnent en perfusion continue de leur chambre de culture, le flux du milieu nourricier n'est pas récupéré et est directement déversé à l'égout augmentant de façon conséquente le prix de revient de la culture.

Or, pour la culture de cellules animales, telles que par exemple les cellules hématopoïétiques ou les cellules hépatiques, un flux nourricier riche en facteurs de croissance s'avère indispensable pour permettre la multiplication et la différenciation desdites cellules. Lesdits facteurs de croissance étant extrêmement coûteux, le fonctionnement d'un bioréacteur ne permettant pas de recycler ces facteurs représente un coût financier considérable, incompatible dans l'optique d'une exploitation clinique.

La présente invention a pour but de remédier à tous ces inconvénients.

- 3 -

Objet de l'invention

Le but de la présente invention est de créer une chambre de culture et un bioréacteur pour la culture extracorporelle de cellules animales, permettant de 5 conserver l'homéostasie du milieu environnant les cellules cultivées et ainsi leur permettre de proliférer dans les meilleures conditions possibles.

Pour parvenir à ce but, l'invention développe les objectifs ci-après exposés.

10 Un objet de l'invention est de maintenir une bonne viabilité cellulaire au sein de ladite chambre de culture et du bioréacteur, et ceci en fournissant d'une part aux cellules du milieu de culture un apport nutritionnel en quantité suffisante et en évacuant d'autre part les 15 déchets et les inhibiteurs générés pour permettre une croissance de la population cellulaire.

Un autre objet de l'invention est de pouvoir recycler les facteurs de croissance du milieu tout en évacuant du 20 milieu de culture suffisamment de déchets cellulaires et de réaliser ainsi l'optimisation économique de la culture des cellules.

Un autre objet de l'invention est de pouvoir effectuer un transfert de gène ciblé sur les cellules cultivées.

25 Un autre objet de l'invention est de maintenir les propriétés physico-chimiques du milieu de culture cellulaire en dépit de la perturbation induite par la croissance cellulaire.

Un autre objet de la présente invention est de 30 garantir la stérilité, l'asepsie de la chambre de culture et du bioréacteur, et en particulier pendant toute la durée de la culture cellulaire.

Un autre objet de l'invention est de récupérer les 35 cellules cultivées au sein de la chambre de culture et du bioréacteur de l'invention.

Sommaire de l'invention

La présente invention est basée sur l'observation qu'une chambre de culture et un bioréacteur pour la

- 4 -

culture extracorporelle de cellules animales pouvaient remédier aux différents inconvénients mentionnés ci-dessus s'ils permettaient à la fois de maintenir une bonne viabilité cellulaire des cellules cultivées tout en 5 recyclant les facteurs de croissance du milieu, assurant ainsi un bon niveau de prolifération cellulaire.

Ainsi, l'invention a pour objet une chambre de culture pour la culture extracorporelle de cellules animales, délimitée par une enveloppe à axe de symétrie 10 qui est formée d'une paroi latérale externe, de deux parois d'extrémités et d'entrées et de sorties de milieux liquides dynamiques, cette chambre étant caractérisée par le fait qu'elle comporte :

- 15 a) au moins deux membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent, perpendiculaires à l'axe de symétrie ;
- b) entre les membranes, un moyen formant support de culture biocompatible permettant l'adhésion des cellules en état de culture ;
- 20 c) deux parois d'extrémités constituant des moyens de distribution des milieux liquides dynamiques ;
- d) trois couples d'entrées et de sorties des milieux liquides dynamiques (F1, F2, F3), destinés à alimenter la chambre de culture des cellules et à extraire 25 sélectivement les cellules cultivées, les déchets résultant de leur culture et les nutriments en excès, deux des couples étant, pour chacun d'entre eux, connectés entre l'une des parois d'extrémités et l'une des membranes, le troisième étant connecté entre les 30 deux membranes planes filtrantes.

L'invention a également pour objet un bioréacteur pour la culture extracorporelle de cellules animales comprenant une chambre de culture, délimitée par une enveloppe à axe de symétrie formée d'une paroi latérale externe, de deux parois d'extrémités et d'entrées et de sorties de milieux liquides dynamiques et comprenant des moyens de circulation desdits milieux dans ladite chambre, 35 ce bioréacteur étant caractérisé en ce qu'il comporte :

- 5 -

a) une chambre de culture desdites cellules comportant au moins deux membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent, perpendiculaires à l'axe de symétrie et qu'entre lesdites membranes à seuil de coupure différent se situe un moyen formant support de culture biocompatible permettant l'adhésion des cellules en état de culture, ladite chambre étant délimitée par une enveloppe à axe de symétrie comprenant deux parois d'extrémités constituant des moyens de distribution des milieux liquides dynamiques et trois couples d'entrées et de sorties des milieux liquides dynamiques F1, F2, F3, destinés à alimenter la chambre de culture des cellules et à extraire sélectivement les cellules cultivées, les déchets résultant de leur culture et les nutriments en excès, dont deux des couples sont, pour chacun d'entre eux, connectés entre l'une des parois d'extrémités et l'une des membranes, le troisième étant connecté entre les deux membranes filtrantes ;

20 b) des moyens de circulation du premier milieu liquide dynamique F1 selon un circuit en boucle fermée et un vase d'expansion R1 contenant ledit milieu, ces moyens étant reliés à ladite chambre de culture ;

25 c) des moyens de circulation du deuxième milieu liquide dynamique F2 selon un circuit en boucle fermée ou en boucle ouverte suivant la fonction attribuée audit milieu et un réservoir R2 contenant ledit milieu, ces moyens étant reliés à ladite chambre de culture ;

30 d) des moyens de circulation du troisième milieu liquide dynamique F3 selon un circuit en boucle ouverte et un réservoir R3 contenant ledit milieu, ces moyens étant reliés à ladite chambre de culture ;

35 e) des moyens de contrôle de régulation et de conditionnement des milieux liquides dynamiques, reliés à un bloc de régulation-commande.

L'invention sera mieux comprise grâce à une description illustrative non limitative de la chambre de

- 6 -

culture et du bioréacteur comprenant ladite chambre au moyen des figures ci-après énoncées :

- 5 - La figure 1 représente une vue schématique d'une chambre de culture cellulaire délimitée par une enveloppe à axe de symétrie de forme hexagonale.
- 10 - La figure 2 représente schématiquement la circulation dynamique des milieux liquides F1 et F3 pour un gradient de pression $p1>p3$ en « phase descendante » au sein de la chambre de culture d'un bioréacteur de l'invention, dans laquelle le moyen formant support de culture biocompatible entre les deux membranes à seuil de coupure différent est un lit de macrosupports.
- 15 - La figure 3 représente schématiquement la circulation dynamique des milieux liquides F1 et F3 pour un gradient de pression $p3>p1$ en « phase ascendante » au sein de la chambre de culture d'un bioréacteur de l'invention, dans laquelle le moyen formant support de culture biocompatible entre les deux membranes à seuil de coupure différent est un lit de macrosupports.
- 20 - La figure 4 représente schématiquement un gradient de pression $p1>p3$ en « phase descendante » au sein de la chambre d'un bioréacteur.
- 25 - La figure 5 représente schématiquement un gradient de pression $p3>p1$ en « phase ascendante » au sein de la chambre de culture d'un bioréacteur selon l'invention.
- 30 - La figure 6 représente un schéma de montage d'un bioréacteur où le bloc de régulation-commande n'est pas représenté.
- 35 - La figure 7 représente schématiquement la circulation dynamique des milieux liquides F1 et F3 pour un gradient de pression $p1>p3$ en "phase descendante" au sein de la chambre de culture d'un bioréacteur de l'invention, dans laquelle le moyen formant support de culture biocompatible est une membrane filtrante, dite de culture.

- 7 -

- La figure 8 représente schématiquement la circulation dynamique des milieux liquides F1 et F3 pour un gradient de pression $p_3 > p_1$ en "phase ascendante" au sein de la chambre de culture d'un bioréacteur de l'invention, dans laquelle le moyen formant support de culture biocompatible est une membrane filtrante, dite de culture.

10 Description détaillée de l'invention

L'invention concerne une chambre de culture cellulaire à axe de symétrie, renfermant à la fois les cellules et le milieu de culture comportant au moins deux membranes filtrantes à seuil de coupure différent et un moyen formant un support de culture biocompatible placé entre deux des membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent, ladite chambre étant délimitée par une enveloppe à axe de symétrie formée d'une paroi latérale externe et de deux parois d'extrémités.

La première membrane, dite membrane d'alimentation a un seuil de coupure choisi dans l'intervalle allant de $0,01\mu\text{m}$ à $7\mu\text{m}$ qui permet les échanges biochimiques au sein de la chambre de culture en autorisant le passage des molécules du milieu nourricier telles que les protéines et les macromolécules, tout en réalisant un confinement cellulaire empêchant les cellules cultivées de quitter la zone d'homéostasie et empêchant également le passage des particules contaminantes en servant notamment de barrière aux bactéries pouvant contaminer ladite chambre.

Une autre membrane filtrante, dite membrane de dialyse, a un seuil de coupure d'au plus 15 KiloDalton (KDa) et autorise quant à elle le confinement moléculaire de toutes les molécules ayant une masse moléculaire supérieure à 15 KDa. La présence de cette membrane filtrante au sein de la chambre de culture permet de définir avec la première membrane un espace de confinement des cellules de culture. Dès lors, la membrane plane filtrante à seuil de coupure d'au plus 15 KDa confine les

- 8 -

cellules en culture dans la chambre de culture, ainsi que les facteurs de croissance et les grosses protéines.

Selon une caractéristique de l'invention, au moins l'une des membranes a un seuil de coupure compris préférentiellement entre 0,2 μm et 4 μm et l'autre un seuil de coupure préférentiellement compris entre 10 et 12 KDa.

Selon l'invention, le nombre de membranes présentes dans la chambre de culture peut être supérieur à deux. 10 Dans ce cas, les membranes supplémentaires ont des seuils de coupure adaptés à ceux des deux membranes précitées.

Selon l'invention, les membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent au sein de la chambre de culture cellulaire sont disposées perpendiculairement par rapport à l'axe de symétrie de ladite chambre de culture.

Selon l'invention, les deux membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent peuvent être des membranes minérales ou organiques. A titre d'exemple, on peut citer des membranes constituées de polymères organiques biocompatibles, de cellulose ou de polysulfone.

De plus, ces deux membranes filtrantes sont distantes l'une de l'autre d'au plus environ 25 mm et préférentiellement d'au plus 20 mm, distance qui s'avère favorable à un bon développement des cellules puisqu'elles sont pratiquement toujours en contact avec les sources de nutriments et d'oxygène.

Entre les deux membranes filtrantes à seuil de coupure différent est placé le moyen formant support de culture biocompatible permettant l'adhésion des cellules 30 en état de culture.

L'un des moyens formant support de culture biocompatible, selon l'invention, peut être un lit de macrosupports biocompatibles constitué de particules de tailles diverses pouvant être éventuellement agglomérées en un bloc continu par frittage d'éléments granulaires. Ce lit peut avoir une épaisseur au plus égale à la distance entre les deux membranes filtrantes à seuil de coupure différent. Ledit lit de macrosupports joue d'une part un

- 9 -

rôle de support des cellules en état de culture et d'autre part un rôle mécanique de maintien de l'espace de confinement cellulaire aménagé entre les deux membranes filtrantes à seuil de coupure différent. Suivant le type 5 de cellules cultivées au sein de la chambre de culture de l'invention, le type de macrosupports biocompatibles sera choisi de façon appropriée et de taille adéquate.

Les macrosupports mis en œuvre entre les deux membranes de la chambre de culture peuvent avoir une forme 10 cylindrique ou sphérique ou encore polyédrique tel que par exemple des blocs massifs usinés.

Selon l'invention, les macrosupports peuvent être d'origine minérale (tel que, par exemple, le corail), d'origine métallique (tel que le titane et ses alliages 15 par exemple) ou encore formés de polymères biocompatibles.

A titre illustratif, dans le cas d'une culture de cellules hématopoïétiques en vue d'une application pour une greffe de moelle osseuse d'une part et dans le cas d'une culture d'ostéoblastes dans un but de reconstruction 20 osseuse d'autre part, les macrosupports peuvent être des microbilles de corail. De telles billes de corail de granulométrie souhaitée s'avèrent être des macrosupports appropriés pour les applications mentionnées ci-dessus du fait notamment de leur aptitude à être colonisées par les 25 progéniteurs hématopoïétiques. Dans le cas des précurseurs osseux, les billes de corail peuvent être de plus métabolisées, ce qui favoriserait leur utilisation en chirurgie reconstructrice.

Alors que, par exemple, dans le cas d'une culture de 30 cellules hépatiques en vue d'une application de détoxication sanguine ex-vivo d'un patient hépato-insuffisant par une biomasse extracorporelle d'hépatocytes, les macrosupports les plus adaptés peuvent être des billes de polyamides, par exemple en nylon®, des 35 billes de polymères fluorés, par exemple en téflon®.

Ainsi, la présence de macrosupports entre lesdites membranes et le fait que la membrane filtrante à seuil de coupure d'au plus 15 KDa n'autorise pas le passage des cellules en culture de même que celui des facteurs de

- 10 -

croissance, permettent le confinement des cellules en culture, qui adhèrent aux dits macrosupports biocompatibles, dans cet espace de confinement cellulaire situé entre les deux membranes à seuil de coupure 5 différent.

Un autre moyen formant support de culture biocompatible selon l'invention, peut être une membrane filtrante dite de culture M2 ayant des caractéristiques 10 particulières la distinguant des autres membranes précédemment évoquées, c'est-à-dire la membrane filtrante dite d'alimentation à seuil de coupure dans l'intervalle allant de 0,01 μm à 7 μm et la membrane dite de dialyse à 15 seuil de coupure d'au plus 15 KDa.

15

Cette membrane de culture, placée entre les deux membranes précitées, peut reposer sur la membrane dite de dialyse à seuil de coupure d'au plus 15 KDa.

20 Ladite membrane de culture peut être une membrane d'origine minérale ou organique, dont la composition peut varier selon les différents types de culture et les conditions de culture.

25 Ainsi, la membrane dite de culture, sur laquelle peuvent se multiplier les cellules de culture, peut être modifiée par greffage de substrats ou par cocultures de cellules.

30 A titre d'exemples illustratifs non limitatifs, divers types de modifications peuvent être mentionnés, qui sont :

- la fixation de ligands pour les molécules d'adhérence de types glycoprotéines,
- ou bien la fixation d'anticorps,

- 11 -

- ou encore la formation d'un substratum à partir d'un premier type cellulaire qui constitue la première culture de cellules adhérentes, opérée dans un autre bioréacteur ou en culture classique, puis après 5 transfert dans la chambre de culture dudit substratum, mise en place d'un deuxième type cellulaire, et optimisation des conditions de la coculture. Toutefois, la formation dudit substratum peut se faire aussi dans la chambre de culture selon l'invention à partir d'un 10 premier type cellulaire, suivie du rinçage dudit substratum, de la mise en place d'un deuxième type cellulaire et de l'optimisation des conditions de cocultures.
- 15 - ou bien la fixation de molécules protéiques.

La membrane de culture qui est également filtrante a un seuil de coupure choisi dans l'intervalle allant de 0,01 μm à 7 μm .

20 Dans le cas de la mise en œuvre d'une telle membrane dite de culture comme moyen formant support de culture biocompatible selon l'invention, placée entre les membranes filtrantes dite d'alimentation à seuil de 25 coupure choisi dans l'intervalle allant de 0,01 μm à 7 μm et dite de dialyse à seuil de coupure d'au plus 15 Kda, ces deux dernières membranes peuvent être soutenues par des supports à mailles appropriées laissant passer les 30 milieux liquides dynamiques F1, F2, et F3 destinés à alimenter la chambre de culture des cellules et à extraire sélectivement les cellules cultivées, les déchets résultant de leur culture et les nutriments en excès.

35 Selon la nécessité, lesdits supports à mailles destinés à soutenir les membranes précitées peuvent être placés au contact de l'une ou l'autre face, ou des deux faces desdites membranes, ainsi qu'au contact de l'une et/ou l'autre face de la membrane de culture.

- 12 -

La chambre de culture cellulaire comme précédemment évoquée comporte une enveloppe à axe de symétrie formée d'une paroi latérale externe et de deux parois d'extrémités que l'on peut assimiler à deux fonds plats 5 situés à chacune des extrémités de ladite paroi latérale.

Cette enveloppe à axe de symétrie peut être constituée par exemple d'un matériau polymère biocompatible ou d'acier inoxydable. A titre de matériaux polymères biocompatibles, on peut citer par exemple les 10 polyoléfines, les polyamides, les polyesters, ou les polymères fluorés et autres.

L'alimentation de la chambre de culture en milieux liquides dynamiques est réalisée de façon homogène du fait 15 de l'excellence de la répartition par les faces internes des parois d'extrémités de l'enveloppe et de la distribution desdits milieux au sein de ladite chambre grâce à des entrées et des sorties de ces milieux judicieusement placées.

20

Les faces internes des deux parois d'extrémités constituent, selon l'invention, des moyens de distribution des milieux liquides dynamiques.

25

Selon un premier type, les faces internes des parois d'extrémités de l'enveloppe à axe de symétrie sont lisses, de telle sorte que la répartition des milieux liquides dynamiques d'alimentation de la chambre de culture au contact des membranes d'alimentation et de dialyse, peut 30 s'effectuer d'une manière homogène et naturellement sans contrainte.

35

Selon un deuxième type, qui assure une alimentation organisée de la chambre de culture, en milieux liquides d'alimentation, au contact des membranes d'alimentation et de dialyse, les faces internes des deux parois d'extrémités de l'enveloppe à axe de symétrie sont pourvues de stries de distribution permettant d'alimenter ladite chambre de culture par deux des trois milieux

- 13 -

liquides dynamiques. Ces stries de distribution constituent un réseau principal de stries dites principales. Ce réseau principal de stries situé sur la face interne de chacune des deux parois d'extrémités, en 5 regard de l'espace de culture cellulaire, peut être divergent à partir de la tubulure d'entrée aménagée dans ladite paroi.

Selon l'invention, le réseau principal de stries dites principales, aussi appelé réseau de distribution 10 permet une répartition homogène des deux milieux liquides dynamiques, qui sont acheminés vers la chambre de culture par l'intermédiaire de conduits biocompatibles dont la ou les extrémités sont connectées au niveau des parois d'extrémités. Le nombre de stries de distribution situées 15 sur la face en regard de l'espace de culture cellulaire de chacune des deux parois d'extrémités est défini de manière à obtenir une bonne dispersion du milieu liquide dynamique dans la chambre de culture et sera déterminé en fonction de la forme de l'enveloppe à axe de symétrie

20 Ledit réseau principal est complété par un réseau secondaire, formé de stries dites secondaires, moins profond et de direction sensiblement orthogonale par rapport au réseau principal de façon à favoriser la circulation entre les zones de distribution délimitées par 25 le réseau principal. Ainsi, les stries secondaires du réseau secondaire sont sensiblement perpendiculaires aux stries du réseau principal. Ce réseau secondaire peut voir son espacement varier de telle sorte que les stries secondaires soient plus rapprochées et plus nombreuses du 30 côté opposé à l'entrée du flux de milieu pour faciliter le drainage et l'évacuation dudit milieu.

Deux stries adjacentes du réseau principal constituent une zone de distribution et deux stries adjacentes du réseau principal recoupées par deux stries 35 adjacentes du réseau secondaire constituent une alvéole de distribution.

Les réseaux principal et secondaire forment un fin réseau "quadrillé" de propagation des milieux liquides dynamiques. L'ensemble de ces deux réseaux peut par

- 14 -

exemple former un réseau maillé du type en forme de gaufre.

Le réseau principal étant situé sur la face en regard de l'espace de culture cellulaire, possède une certaine 5 hauteur et une certaine largeur que l'homme du métier est tout à fait à même de pouvoir définir, sachant que le réseau de stries doit être au contact de la membrane plane filtrante pour assurer la cohésion de l'ensemble. En effet, le volume ménagé par l'ensemble solidaire du réseau 10 de stries et de la membrane forme le quadrillage de distribution du flux liquidien qui peut représenter environ 50% de la surface de la membrane.

Ainsi, par exemple, le réseau principal peut être constitué de stries principales ayant une profondeur d'au 15 plus 5 mm et une largeur d'au plus 2 mm, le pas compris entre deux stries adjacentes dudit réseau principal pouvant être d'au plus 2 mm. De même, le réseau secondaire peut être constitué de stries secondaires ayant une profondeur d'au plus 2 mm et une largeur d'au plus 2 mm, 20 le pas compris entre deux stries adjacentes dudit réseau diminuant progressivement depuis le côté d'entrée du flux de milieu vers la sortie dudit flux de milieu. De ce fait, dans sa partie distale -c'est à dire du côté de la sortie du milieu- le pas du réseau secondaire sera d'au plus 25 2 mm.

Dès lors, les parois d'extrémités peuvent être envisagées comme réalisant un fin motif d'alvéoles par exemple de type gaufre sur lequel les membranes à seuil de coupure différent viennent prendre appui ou sont collées 30 par une colle biocompatible de type colle polymère.

Quant à l'enveloppe à axe de symétrie de la chambre de culture, elle est formée d'une paroi latérale externe et de deux parois d'extrémités.

35

La paroi latérale externe peut être formée d'au moins trois tronçons de même section, chacun ayant une hauteur adéquate, qui peut être identique. Ces au moins trois tronçons de paroi constituent les parois externes d'au

- 15 -

moins trois modules superposables (C1, C2, C3), dont deux (C1 et C3) reçoivent les parois d'extrémité de l'enveloppe à axe de symétrie de la chambre de culture, le troisième module (C2), intercalé entre les deux précédents, recevant 5 à l'une de ses extrémités la membrane plane filtrante (M1) dite d'alimentation à seuil de coupure compris dans l'intervalle allant de 0,01 μm à 7 μm et son autre extrémité, la membrane plane filtrante dite de dialyse à seuil de coupure d'au plus 15 KDa.

10

Ces au moins trois modules sont superposables et sont reliés les uns aux autres de manière étanche grâce à des joints d'étanchéité, par un moyen de fixation approprié, tel que, par exemple, par collage, montage mécanique par 15 vis ou autre.

La forme de l'enveloppe à axe de symétrie de la chambre de culture selon l'invention peut être choisie de façon appropriée pour faciliter par exemple un empilement 20 de plusieurs chambres de culture sur un support. L'homme du métier est à même de choisir la forme de l'enveloppe à axe de symétrie de ladite chambre de culture selon l'usage qu'il en sera fait. A titre d'exemple, on peut envisager une enveloppe à axe de symétrie, à section de forme 25 circulaire ou polygonale.

Il convient de souligner qu'un empilement de modules pour chambres de culture peut être réalisé à la condition que lesdits modules aient la même forme pour obtenir un empilement stable de ces modules sur un support adéquat.

30 Par exemple, selon un mode d'exécution d'une chambre de culture par empilement de plusieurs modules, une forme par exemple hexagonale peut faciliter l'empilement successif de ces modules sur un socle approprié possédant par exemple six colonnes. Dans ce cas, les six colonnes du 35 socle jouant le rôle de support pour l'empilement de ces modules peuvent également servir par exemple de conduits d'alimentation et d'évacuation des milieux liquides dynamiques.

- 16 -

Quant à l'alimentation en milieux liquides dynamiques de la chambre de culture selon l'invention, elle est réalisée par un système à trois milieux liquides dynamiques, à savoir un système à trois flux de milieux 5 distincts (figures 1 à 8).

Un premier milieu liquide dynamique (F1), entrant et sortant par des tubulures biocompatibles connectées sur la paroi latérale du module (C1) proche d'une des parois 10 d'extrémités de l'enveloppe à axe de symétrie (par exemple la paroi d'extrémité supérieure) alimente le milieu de culture en milieu nutritif (encore appelé milieu nourricier riche), ce milieu étant riche en facteurs de croissance. Ce premier milieu liquide dynamique est 15 composé d'éléments nécessaires à la culture des cellules tels que par exemple de protéines, d'oligo-éléments, de glucose, d'eau et de facteurs de croissance, et alimente le milieu de culture en milieu nutritionnel frais.

20 Un deuxième milieu liquide dynamique (F2) entrant et sortant par des tubulures biocompatibles connectées sur la paroi latérale externe du module (C2) formant une partie de l'enveloppe à axe de symétrie de la chambre de culture peut présenter trois fonctions distinctes selon les usages 25 qui en seront faits.

Selon une première fonction, ce deuxième milieu liquide dynamique (F2), entrant par une tubulure biocompatible connectée au niveau de la paroi latérale de la chambre de culture du module (C2), sert à introduire 30 dans ledit module de ladite chambre les cellules destinées à être cultivées et à récupérer lesdites cellules cultivées au sein dudit module de la chambre après leur culture (cellules hématopoïétiques ou cellules hépatiques par exemple).

35 Selon une deuxième fonction, ce deuxième milieu liquide dynamique peut jouer le rôle de transfert de gènes. En effet, lors de l'introduction des cellules de culture en suspension dans le module (C2) de la chambre de culture par l'intermédiaire de ce deuxième milieu liquide

- 17 -

dynamique, des particules virales contenues dans ledit milieu liquide peuvent se fixer aux cellules en suspension au niveau de leurs membranes et permettre ainsi le transfert de gènes désiré. Ce deuxième flux de milieu peut 5 permettre d'obtenir les cellules de culture souhaitées, génétiquement modifiées, que l'on désire cultiver. Ce milieu transporte en effet les vecteurs de transfert génique et permet leur mise en contact avec les cellules afin d'établir une fusion membranaire entre la cellule 10 cible et le vecteur de transfert de gène. Ces vecteurs de transfert génique sont de toute nature. A titre d'illustration, on peut citer les virus comme par exemple les adénovirus, les rétrovirus, les liposomes, des complexes plasmidiques.

15 Un tel marquage des cellules (par l'injection de vecteurs de transfert de gène) réalisé en dehors du corps humain peut permettre de cibler avec précision le tissu à modifier génétiquement. De plus, on peut utiliser par exemple un virus synthétique à usage unique pour cibler le 20 transfert de gène sur une population cellulaire d'intérêt thérapeutique. Ce virus caractérisé en ce que les gènes codant pour l'enveloppe et ceux qui véhiculent l'information génétique à proprement parler sont séparés, est incapable de se reproduire à l'intérieur des cellules 25 après avoir transféré l'information génétique souhaitée. Ainsi les risques de genèse d'un virus recombinant à partir du virus synthétique utilisé et d'un virus sauvage qui pourrait être présent chez le patient sont limités.

Selon une troisième fonction, ce deuxième milieu 30 liquide dynamique (F2) peut jouer le rôle de flux de rinçage des macromolécules inhibitrices présentes au niveau de l'espace de confinement cellulaire. En effet, les cellules mises en culture peuvent avoir subi un stress avant leur récolte ou lors de leur traitement pré- 35 inoculaire ou encore pendant leur inoculation dans la chambre de culture. Ce stress peut induire la production (par lesdites cellules) de protéines qui vont inhiber leur capacité à se multiplier en les faisant passer dans un état de dormance, appelé état quiescent. Durant cet état,

- 18 -

lesdites cellules ne sont plus en état physiologique de répondre à la stimulation réalisée par les facteurs de croissance, en se multipliant.

Dans le cas des cellules hématopoïétiques, on peut 5 citer le stress « radio-induit » qui est provoqué par une exposition à des rayonnements ionisants (volontaires à usage radiothérapeutique ou accidentelles) et se traduit ultérieurement par un stress. Ce type de stress entraîne 10 la production d'inhibiteurs tels que par exemple le « Transforming Growth Factor-béta » ou le « Tumor Necrosis Factor-alpha ». Ces molécules inhibitrices étant des cytokines au même titre que les facteurs de croissance apportés pour la culture de cellules hématopoïétiques, 15 elles sont donc confinées par les membranes à seuil de coupure différent de la chambre de culture.

Pour effectuer une culture appropriée des cellules, il faut éliminer du milieu de culture et donc de la chambre de culture ces molécules inhibitrices. Le deuxième 20 milieu liquide dynamique dans sa troisième fonction sert dès lors à rincer la zone de confinement cellulaire pour éliminer lesdites molécules inhibitrices.

Un troisième milieu liquide dynamique (F3), entrant 25 et sortant par des tubulures biocompatibles connectées sur la paroi latérale du module (C3) proche de la deuxième des parois d'extrémités de l'enveloppe à axe de symétrie (par exemple la paroi d'extrémité inférieure) alimente le milieu de culture en milieu nutritif de base (encore appelé milieu nutritif de base-régénérant-). Ce milieu 30 nutritif de base est un milieu nourricier totalement dépourvu de facteurs de croissance. Un tel milieu de base est composé par conséquent de glucose, d'eau, d'oligo-éléments tels que par exemple des vitamines et des minéraux, de colorants pour évaluer le pH du milieu et de 35 protéines de type albumine.

Selon l'invention, cette chambre de culture destinée à être alimentée par le système à trois milieux liquides dynamiques distincts (F1, F2, F3) (encore appelé triple

- 19 -

flux) a pour caractéristique trois couples d'entrées et de sorties desdits milieux. Deux de ces couples (F1, F3) sont connectés proches des parois d'extrémités pour alimenter les modules (C1) et (C3) et permettre leur 5 distribution au contact des membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent. Le troisième couple (F2) est connecté à la paroi latérale externe à un niveau se situant entre les deux membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent, c'est-à-dire connecté sur le module 10 (C2).

La disposition décalée de ces couples d'entrées et de sorties des milieux sur l'enveloppe délimitant la chambre de culture permet d'obtenir une homogénéité de distribution desdits milieux liquides au sein de ladite 15 chambre (voir figure 1).

Selon les caractéristiques de l'invention, les tubulures d'entrées et de sorties du système triple flux sont par conséquent réparties de manière appropriée sur l'enveloppe à axe de symétrie de la chambre de culture.

Conformément à la figure 1, la tubulure biocompatible d'entrée du premier flux notée EF1 est connectée à un niveau proche de la paroi d'extrémité supérieure de l'enveloppe de la chambre de culture, alors que la tubulure de sortie notée SF1 du premier flux est également 20 connectée sur la même paroi d'extrémité mais à l'opposé de la tubulure d'entrée.

La tubulure biocompatible d'entrée du troisième flux notée EF3 est quant à elle connectée à un niveau de la paroi d'extrémité inférieure de ladite enveloppe de telle 30 sorte que cette tubulure soit connectée selon un angle d'environ 120 ° par rapport à la tubulure d'entrée du premier flux (EF1) nourricier riche en facteurs de croissance, pour permettre une bonne répartition desdits milieux au sein de la chambre de culture. Par ailleurs, la 35 tubulure biocompatible de sortie de ce troisième flux notée SF3 est également connectée sur la même paroi d'extrémité mais à l'opposé de la tubulure d'entrée dudit flux (EF3).

- 20 -

Conformément à la figure 1, la tubulure biocompatible d'entrée du deuxième milieu liquide dynamique notée EF2 est connectée entre les deux membranes planes filtrantes notées (M1) et (M3), qui ont respectivement un seuil de 5 coupure de 0,22 µm et de 10 KDa, au niveau de la paroi latérale externe de l'enveloppe selon un angle d'environ 60 ° par rapport à la tubulure d'entrée du premier flux (EF1). La tubulure biocompatible de sortie notée SF2 quant à elle est connectée à l'opposé de la tubulure d'entrée 10 dudit flux sur la paroi latérale.

En conséquence, les trois couples d'entrées et de sorties des milieux liquides dynamiques sont placés dans trois plans verticaux passant par l'axe de symétrie de l'enveloppe, ces plans étant décalés d'un angle d'environ 15 60° entre la première entrée et la deuxième entrée, et d'un angle d'environ 120° entre la première entrée et la troisième entrée des milieux liquides dynamiques, les sorties desdits milieux liquides étant dans les mêmes dispositions angulaires.

20

La présente invention concerne également un bioréacteur comportant la chambre de culture cellulaire précédemment décrite. Cette chambre de culture, au moyen de ces trois couples d'entrées et de sorties des milieux 25 liquides dynamiques, est reliée par des conduits de liaison à des réservoirs d'alimentation et/ou des réservoirs d'évacuation de ladite chambre. Le bioréacteur selon l'invention comporte en outre des moyens de régulation des conditions de culture et de contrôle de 30 transfert de masse desdits milieux liquides dynamiques, reliés au bloc de régulation-commande dudit bioréacteur.

Ainsi, ce bioréacteur comporte outre la chambre de culture « un bloc de régulation encore appelé bloc de commande » qui permet le contrôle et la régulation du pH, 35 de la concentration en oxygène et de la température du milieu de culture. Le « bloc de régulation-commande » peut gérer en automatique le fonctionnement complet du bioréacteur. Cette régulation est de type P.I.D. Numérique (régulation numérique Proportionnelle, Intégrale et

- 21 -

Dérivée) et les données renvoyées par les différentes sondes peuvent être enregistrées et analysées par informatique.

Dès lors, le bioréacteur de l'invention contenant la 5 chambre de culture mentionnée précédemment, est organisé en modules unitaires fonctionnels interchangeables dimensionnés pour une certaine valeur de transfert de masse ou d'énergie (tels que, par exemple, des modules d'aération, des échangeurs thermiques), constituant un 10 ensemble modulaire redimensionnable par juxtaposition d'unités fonctionnelles identiques en série et/ou en parallèle, et est doté d'un bloc de régulation-commande programmable.

Le bloc de régulation-commande reçoit l'ensemble des 15 informations relatives aux milieux liquides dynamiques F1, F2, F3, par les moyens de contrôle et de régulation, ainsi que les informations relatives aux divers réservoirs, pompes, vannes et pressions régnant dans les zones-modules C1, C2, C3 de la chambre de culture, les gère et émet les 20 ordres de fonctionnement nécessaires.

De ce fait, il est possible de modifier à la demande les caractéristiques internes de la chambre de culture et de changer les paramètres et les programmes de régulation concourant à l'homéostasie du milieu afin de s'adapter au 25 type cellulaire cultivé.

L'ensemble de régulation peut posséder également une cellule cristalline de mesure de spectre infrarouge, qui permet par déconvolution du spectre de réémission de mesurer la concentration de certains solutés dans le 30 milieu de culture. Il est alors possible de suivre « en ligne » et « en temps réel » les concentrations de glucose et de lactate.

Ainsi, la température du milieu de culture peut être fixée à une valeur de consigne comprise entre 30 et 38 °C. 35 Pendant la croissance cellulaire, le pH du milieu de culture peut être fixé à une valeur de consigne comprise entre 6,5 et 7,7. Le bloc de régulation-commande permet aussi de régler le débit d'air et le taux de CO₂ qui par

- 22 -

sa dissolution donne l'amphotère HCO_3^- qui tamponne le milieu et concourt à la stabilité du pH.

Selon l'une des caractéristiques du bioréacteur de l'invention, les tubulures d'entrée et de sortie (de la chambre) du premier milieu liquide dynamique F1 sont reliées par des conduits de liaison à un réservoir R1 de milieu nourricier riche en facteurs de croissance selon un circuit en boucle fermée permettant le recyclage des facteurs de croissance nécessaires au développement des cellules en culture. Ce réservoir R1 peut jouer le rôle de vase d'expansion.

Selon l'une des caractéristiques de ce bioréacteur, ledit conduit de liaison entre la tubulure d'entrée du premier milieu nourricier riche F1 de la chambre et ledit réservoir noté R1 de ce milieu est équipé d'une pompe P1 permettant de contrôler et d'ajuster le volume et le débit du milieu F1 circulant en circuit fermé dans la chambre de culture.

La boucle fermée véhiculant le flux nourricier riche F1 dispose d'une mise à l'air qui se situe sur le vase d'expansion R1, cette mise à l'air est munie d'un filtre à seuil de coupure de $0,22 \mu\text{m}$ garantissant l'asepsie du milieu. De même, cette boucle est munie d'une électrovanne V1 commandée par le bloc de régulation-commande programmable permettant l'équilibrage de pression avec la pression atmosphérique à la demande. Le vase d'expansion R1 est également muni de capteurs de niveau haut et de niveau bas de milieu liquide servant à déclencher l'inversion de la circulation des fluides.

Selon une autre caractéristique du bioréacteur de l'invention, la tubulure d'entrée du troisième milieu nourricier de base (EF3) de la chambre de culture est reliée par un conduit de liaison à un réservoir noté R3 de ce milieu, et la tubulure de sortie (SF3) est reliée par un conduit à l'égout (compartiment de récupération des déchets).

Selon l'invention, le conduit de liaison relié à la tubulure d'entrée du troisième milieu liquide dynamique EF3 mentionnée ci-dessus est équipé d'une pompe P3 alors

- 23 -

que le conduit relié à la tubulure de sortie dudit flux est équipé d'une vanne V3 éventuellement pilotée par le bloc de régulation-commande, l'ensemble permettant de régler et de contrôler le volume et le débit dudit 5 troisième milieu F3 circulant en circuit ouvert dans la chambre de culture.

Selon l'invention, un dispositif aérateur du milieu nourricier riche F1 et un dispositif aérateur du milieu nourricier de base F3 sont prévus sur l'un et l'autre des 10 deux circuits en boucles fermée et ouverte placés respectivement entre les entrées desdits milieux liquides dynamiques F1 et F3 dans la chambre de culture cellulaire et les réservoirs R1 et R3.

Selon l'invention, un échangeur thermique du milieu 15 nourricier riche F1 et un échangeur thermique du milieu nourricier de base F3 sont prévus sur chacun des deux circuits en entrées desdits milieux liquides dynamiques F1 et F3 dans la chambre de culture cellulaire.

Ces dispositifs permettent de maintenir l'homéostasie 20 de la chambre de culture en préconditionnant les flux de milieux qui y pénètrent afin de ne pas faire entrer dans la chambre de culture un élément de volume de milieu de culture pouvant induire une brutale perturbation de ses paramètres physico-chimiques.

Selon une autre caractéristique du bioréacteur de 25 l'invention, la tubulure d'entrée du deuxième milieu liquide dynamique EF2 de la chambre de culture, située au niveau de la paroi latérale de l'enveloppe, est reliée par un conduit de liaison à un réservoir noté R2 contenant le 30 deuxième milieu liquide dynamique choisi en fonction du rôle qui lui est attribué, à savoir soit alimenter la chambre de culture en cellules destinées à être cultivées et à décharger ladite chambre après culture, soit effectuer un transfert de gènes, soit avoir un rôle de 35 flux de rinçage destiné à décharger la chambre de culture des molécules inhibitrices des cellules à cultiver.

Selon la fonction attribuée au deuxième milieu liquide dynamique de la chambre de culture, la tubulure de

- 24 -

sortie SF2, située à l'opposé de la tubulure d'entrée EF2 sur ladite paroi, sera reliée :

- par un conduit de liaison à un réservoir de récupération de cellules après culture (à savoir une poche de récolte) ou à l'égout (compartiment d'élimination des molécules inhibitrices) selon un circuit en boucle ouverte ou
- par un conduit de liaison à un réservoir contenant le milieu pourvu de vecteurs appropriés de transfert de gènes selon un circuit en boucle fermée.

Selon une autre caractéristique du bioréacteur de l'invention, un ou plusieurs modules fonctionnels échangeurs de milieux, encore appelés dialyseurs ou ultrafiltreurs, peuvent être ajoutés pour purifier le milieu nourricier F1 en sortie de la chambre de culture. Ces modules fonctionnels échangeurs de milieux sont situés à l'extérieur de la chambre de culture, montés en série sur le conduit de liaison de sortie du circuit en boucle fermée du premier milieu nourricier F1 riche en facteurs de croissance et parcourus à contre courant par le milieu nourricier F3 de base en boucle ouverte.

Dans le cas de l'utilisation de deux modules fonctionnels connectés en série de façon ad hoc sur la boucle fermée F1, on peut utiliser deux seuils de coupure différents de, par exemple, 10 KDa et de 30 KDa. On peut, en injectant le flux issu du module 10 KDa dans le module de 30 KDa, et en récupérant le perméat -c'est à dire la fraction liquide qui a traversé la membrane à seuil de coupure 30 KDa- pour le réinjecter dans la boucle F1, réaliser un fenêtrage des protéines du milieu entre 10 et 30 KDa qui correspond à la taille des facteurs de croissance.

De tels modules fonctionnels additionnels peuvent s'avérer utiles lorsque, par exemple, les facteurs de croissance sont produits par des cellules de support dans une première chambre de culture annexe, et que l'on désire conditionner ce milieu (c'est à dire récupérer les

- 25 -

facteurs de croissance produits, sans récupérer les déchets cellulaires générés par ces cellules de supports) pour pouvoir le réutiliser dans la boucle F1 afin de stimuler les cellules dites d'intérêt thérapeutique 5 présentes dans la chambre de culture principale.

Il convient de noter que le procédé utilisé pour cultiver des cellules hématopoïétiques et/ou sanguines, peut utiliser des cellules de support dites cellules stromales. Ces cellules stromales peuvent être modifiées 10 génétiquement de façon à produire des cytokines humaines à des niveaux d'expression tels qu'ils peuvent subvenir pour partie aux besoins en cytokines de la culture.

Par ailleurs, il convient de souligner que l'enveloppe à axe de symétrie permettant d'obtenir une 15 homogénéité de distribution des nutriments avec une dispersion optimale a l'avantage d'être stérile au même titre que tous les éléments du bioréacteur en contact avec les cellules et le milieu de culture. En effet, la stérilisation du bioréacteur est réalisée par autoclavage 20 à 121 °C pendant 20 minutes de l'ensemble de l'appareil ainsi que des bouteilles de réservoirs. Les conduits de liaison, les réservoirs et autres éléments d'étanchéité sont réalisés en des matériaux biocompatibles pouvant 25 supporter sans dommage une dizaine de cycles de stérilisation dans le cas d'une utilisation en laboratoire. Par contre, l'ensemble chambre de culture, conduits de liaison, réservoirs de milieux et autres constituera un kit de culture à usage unique dans le cas d'une utilisation en clinique humaine.

30 Par ailleurs, le reconditionnement du bioréacteur après une culture cellulaire, dans le cadre d'une utilisation de type laboratoire, se fait par une digestion protéique avec une solution d'acide chlorhydrique Molaire suivie d'un rinçage ultra pure, d'une re-stérilisation.

35

Selon le mode de fonctionnement du bioréacteur de l'invention et conformément aux figures 2 et 7, le milieu nourricier riche F1 est introduit au niveau de la paroi d'extrémité supérieure de l'enveloppe dans la zone (C1)

- 26 -

(module ou compartiment C1) de la chambre de culture comprise entre ladite paroi et la membrane plane filtrante à seuil de coupure de l'ordre de 0,01 μm à 7 μm , par l'ouverture de la pompe P1 située sur le conduit de 5 liaison reliant la chambre de culture au réservoir R1 contenant ledit milieu F1 alors que la pompe P3 située sur le conduit de liaison reliant la chambre de culture au réservoir R3 contenant le milieu nourricier de base F3 est à l'arrêt. De plus, la pression p3 régnant dans la zone 10 (C3) (module ou compartiment C3) de la chambre de culture située entre la paroi d'extrémité inférieure de l'enveloppe et la membrane plane filtrante à seuil de coupure d'au plus 15 KDa, est réglée par la vanne de contre pression notée V3 située sur le conduit reliant la 15 chambre de culture à l'égout de telle sorte que la pression p1 régnant dans la zone C1 de la chambre de culture est supérieure à la pression p3 et que la pression p2 régnant dans la zone (C2) (module ou compartiment C2) soit comprise entre p1 et p3 selon un gradient de 20 pression.

Ainsi, lors de l'introduction du premier milieu liquide dynamique F1 dans la chambre de culture par l'ouverture de la pompe P1, les facteurs de croissance du milieu nutritif passent dans la zone notée C1 et au 25 travers de ladite membrane à seuil de coupure de l'ordre de 0,01 μm à 7 μm de la chambre de culture, mais sont retenus par la membrane plane filtrante à seuil de coupure d'au plus 15 KDa, qui joue un rôle de barrière pour le passage des facteurs de croissance et des grosses 30 protéines.

Par conséquent, les facteurs de croissance peuvent migrer de part et d'autre de la membrane plane filtrante à seuil de coupure de l'ordre de 0,01 μm à 7 μm assurant leur rôle de stimulation de la croissance et/ou de 35 contrôle de la différenciation pour les cellules en état de culture confinées entre les deux membranes planes de la chambre de culture définissant la zone C2 (module ou compartiment C2) de ladite chambre.

- 27 -

Conformément à la figure 4, la membrane plane filtrante M3 à seuil de coupure d'au plus 15 KDa confine les facteurs de croissance et les grosses protéines du milieu nutritif frais F1 dans les zones C1 et C2 de la chambre de culture. Par contre, les oligo-éléments dudit milieu nutritif F1 et les déchets de petites tailles (tels que, par exemple, NO, NH₄⁺, lactate et autres) générés par la culture des cellules confinées dans la zone C2 de ladite chambre, sont drainés vers la zone C3 où ils sont emportés vers l'égout. Le flux transmembranaire global est par conséquent orienté de la zone C1 vers la zone C3 de la chambre de culture (voir figures 2 et 7).

Dans ce mode de fonctionnement du bioréacteur selon l'invention, mode appelé « phase descendante », le milieu nutritif frais F1 circulant en boucle fermée perd de la volumétrie du fait du drainage de la solution aqueuse vers la zone C3 et notamment vers l'égout. Par conséquent, le volume de milieu nourricier F1 dans le réservoir R1 diminue. Les facteurs de croissance et les grosses protéines du milieu nutritif frais F1 étant confinés dans les zones C1 et C2, les déchets sont purgés des zones de la chambre de culture vers la zone C3 et sont drainés vers l'égout au moyen de la vanne V3 ouverte.

Dès que le volume du réservoir R1 ou vase d'expansion de la boucle fermée véhiculant le milieu nutritif frais F1 atteint un certain niveau bas, le bloc de régulation-commande du bioréacteur programmé selon une séquence particulière inverse la circulation de flux. De ce fait, la pompe P1 qui marchait passe à l'arrêt et la pompe P3 à l'arrêt se met en marche. Et, la vanne V3 ouverte est alors fermée.

Par conséquent, la pression p1 régnant dans la zone C1 de la chambre de culture devient inférieure à la pression p3, alors que la pression p2 régnant dans la zone C2 est comprise entre p1 et p3, selon un gradient de pression inversé par rapport au mode de fonctionnement précédent. Le flux transmembranaire global est alors orienté de la zone C3 vers la zone C2 de la chambre de culture (voir figures 3 et 8). Dans ce mode de

- 28 -

fonctionnement du bioréacteur et conformément aux figures 3, 8 et 5, mode appelé «phase ascendante», l'inversion de flux au sein de la chambre de culture permet au milieu nutritif frais F1 circulant dans la chambre de culture de 5 se recharger en éléments nutritifs frais provenant du troisième milieu liquide dynamique F3 et de compenser les pertes occasionnées, entre autre l'eau, par la « phase descendante ». En effet, ce milieu de base(régénérant) F3 réalimente la chambre de culture cellulaire en glucose, en 10 eau, en oligo-éléments.

Dès que le volume du réservoir R1 ou vase d'expansion du circuit en boucle fermée véhiculant le milieu nutritif frais F1 atteint un certain niveau haut, le système de contrôle du bioréacteur programmé selon une séquence 15 particulière inverse à nouveau la circulation de flux.

Ainsi, les facteurs de croissance du fait de la circulation en boucle fermée du milieu nourricier riche F1, c'est-à-dire du premier milieu liquide dynamique dont ils font parties, sont confinés dans la boucle fermée et 20 dans les zones C1 et C2, et leur concentration oscille entre une concentration C_0 et $C_0+/-\Delta C$. Le milieu de culture riche est donc recyclé et l'utilisation des facteurs de croissance optimisée grâce à la chambre de culture et au bioréacteur de l'invention.

25 Ce système d'inversion de flux au sein de la chambre de culture permet de créer des flux transmembranaires présentant de faibles contraintes hydrodynamiques compatibles avec la fragilité des cellules cultivées. On obtient ainsi un système de flux lents « laminaires ». 30 Cette inversion des flux peut également prévenir le colmatage des membranes filtrantes dont la perte de charge transmembranaire (indice mesurant la perméabilité de la membrane) pourra être contrôlée en temps réel par des manomètres électroniques placés sur chacun des flux de 35 milieux liquides dynamiques.

Dans le mode de fonctionnement du bioréacteur de l'invention, le deuxième milieu liquide dynamique (F2) entrant et sortant au niveau de la paroi latérale externe,

- 29 -

entre les deux membranes planes filtrantes de la chambre de culture, circule au sein de ladite chambre selon un circuit en boucle ouverte ou en boucle fermée suivant la fonction qu'il lui est attribuée, les pompes P1 et P3 5 étant à l'arrêt, et sa configuration d'entrée et sortie est fixée par la fonction qu'on veut lui attribuer.

Selon le mode de fonctionnement du bioréacteur, lorsque le deuxième milieu liquide dynamique F2 dans sa première fonction sert à inoculer les cellules à cultiver 10 dans la chambre de culture et à les décharger après culture, il fonctionne en boucle ouverte au même titre que lorsqu'il sert dans sa troisième fonction à rincer la chambre pour éliminer les molécules inhibitrices. Par contre, lorsque le milieu liquide dynamique F2 a un rôle 15 de transfert de gènes, il fonctionne en boucle fermée le temps de l'inoculation et de l'incubation.

Dans sa première fonction et selon le mode de fonctionnement du bioréacteur conformément à la figure 6, le deuxième milieu liquide dynamique F2 contenant les 20 cellules à cultiver est inoculé dans la zone C2 de la chambre de culture par une seringue au travers d'un septum biocompatible positionné sur l'une des trois branches de la tubulure d'entrée EF2 (de la paroi latérale externe) dont l'électrovanne V2E1 est ouverte, les électrovannes 25 V2E2 et V2E3 étant fermées. Lors de l'inoculation dudit milieu, les trois électrovannes V2S1, V2S2 et V2S3 situées sur les trois branches de la tubulure de sortie SF2 aménagée à l'opposé de la tubulure d'entrée EF2 sont fermées.

30 Lors de la récupération des cellules après culture, les deux électrovannes V2E2 et V2E3 de la tubulure d'entrée EF2 sont fermées, l'électrovanne V2S1 située sur l'une des trois branches de la tubulure de sortie SF2 reliée à un conduit de liaison au réservoir de 35 récupération des cellules cultivées, est ouverte alors que les électrovannes V2S2 et V2S3 des deux autres branches de la tubulure de sortie SF2 sont fermées. Le milieu de base régénérant est alors pompé par mise en route de la pompe P2 depuis le réservoir R2 et sert à purger le contenu du

- 30 -

compartiment C2 (compris entre les deux membranes à seuil de coupure différent) dans la poche de collecte cellulaire. Un traitement enzymatique de type trypsine et/ou collagénase et/ou DNase pourra être employé pour 5 déstructurer la matrice extracellulaire produite par les cellules durant la culture pour faciliter leur ancrage. Dans le cadre, d'une culture de cellules hématopoïétiques sur un macrosupport de type corallien, une acidification légère du milieu à pH=6.0 ou pH=6.5 permettra de dissoudre 10 le corail et de récupérer les cellules hématopoïétiques après rinçage.

Dans sa troisième fonction et selon le mode de fonctionnement du bioréacteur, le deuxième milieu liquide dynamique F2 contenant les éléments nécessaires au rinçage 15 de l'espace de confinement cellulaire fonctionne en boucle ouverte selon le même principe de fermeture et d'ouverture des électrovannes que le fonctionnement décrit ci-dessus à l'exception que la tubulure d'entrée n'est pas munie d'un septum biocompatible mais est reliée par un conduit de 20 liaison au réservoir R2 contenant ledit milieu F2 choisi.

Lors de l'introduction du milieu de rinçage F2 dans la zone C2 de la chambre de culture au niveau de l'une des trois branches de la tubulure d'entrée EF2 (de la paroi latérale externe) dont l'électrovanne V2E3 est ouverte, 25 les électrovannes V2E1 et V2E2 sont fermées. Lors de l'introduction et de la récupération dudit milieu de rinçage, les deux électrovannes V2S1, V2S2 situées sur les deux branches de la tubulure de sortie SF2 sont fermées, l'électrovanne V2S3, située sur l'autre branche de la 30 tubulure de sortie SF2 étant ouverte, le flux de rinçage circulant en continu en boucle ouverte. La sortie de l'électrovanne V2S3 peut être raccordée sur une tubulure menant à l'égout. L'égout est constitué d'un réservoir de milieu stérilisé en même temps que l'ensemble des 35 tubulures du bioréacteur, de ses réservoirs, de ses modules fonctionnels et de la chambre de culture, ce qui garantit la stérilité de l'écoulement. Deux filtres de 0,22 µm pourront être rajoutés sur ce tout à l'égout de façon à augmenter la sécurité et à garantir la stérilité,

- 31 -

notamment lorsqu'il faudra changer "à chaud" le réservoir d'égout par la suite d'un trop plein.

Dans sa deuxième fonction et selon le mode de fonctionnement du bioréacteur conformément à la figure 6, 5 le deuxième milieu liquide dynamique F2 contenant les vecteurs de transfert génique est introduit dans la zone C2 de la chambre de culture par l'ouverture de l'électrovanne V2E2 située sur l'une des trois branches de la tubulure d'entrée EF2, les électrovannes V2E1 et V2E3 10 étant fermées. Lors de l'introduction dudit milieu, les deux électrovannes V2S1, V2S3 situées sur deux branches de la tubulure de sortie SF2 sont fermées. Ce milieu F2 contenant les vecteurs de transfert génique circule en 15 boucle fermée le temps nécessaire à l'inoculation et à l'incubation. Lorsque la procédure de transfert de gènes est terminée, la boucle F2, repasse en mode de rinçage tel que décrit ci-dessus, afin de rincer les éventuels vecteurs résiduels. Puis, le rinçage étant fini, la 20 culture se poursuit selon l'alternance des phases "ascendante" et "descendante" des flux F1 et F3.

Il convient de noter que l'un des épiphénomènes non désiré lors de l'inversion de flux de la phase descendante vers la phase montante est la possibilité que le milieu F1 25 soit légèrement contaminé par des déchets provenant des zones C2 et C3. Or il s'avère que le phénomène de dilution rend cette possible contamination négligeable. De plus, la partie proximale du conduit de liaison reliant le réservoir de milieu de base F3 et la chambre de culture 30 est chargée de milieu F3 frais, c'est-à-dire provenant dudit réservoir, seule la partie distale du conduit reliant la chambre de culture à l'égout, c'est-à-dire près de la vanne V3, se charge en déchets.

La chambre de culture et le bioréacteur selon 35 l'invention peuvent être utilisés pour la culture extracorporelle de cellules animales et, à ce titre, l'invention concerne le domaine médical. A titre illustratif, la chambre de culture et le bioréacteur selon

- 32 -

l'invention peuvent s'appliquer à la production de cellules hématopoïétiques ou de cellules hépatiques.

La présente invention trouve ainsi son application pour la culture extracorporelle de cellules de la moelle osseuse. L'hématopoïèse est le processus physiologique qui permet de renouveler tous les éléments figurés du sang (les cellules sanguines matures ayant une durée de vie limitée) par la multiplication et la différenciation d'une cellule primitive originelle multipotente (appelée cellule souche) capable d'engendrer tous les types cellulaires, cellules sanguines encore appelées éléments figurés du sang. Ce processus est sous le contrôle de facteurs de croissance hématopoïétique, aussi appelés cytokines.

La greffe de cellules hématopoïétiques immatures, appelées progéniteurs hématopoïétiques, chez un patient soumis à une aplasie accidentelle ou consécutive à un traitement anticancéreux est un moyen de pouvoir relancer l'activité de la moelle osseuse lésée pour amorcer une reprise de l'hématopoïèse.

Ce processus implique que des progéniteurs -cellules à un stade précoce de développement- soient prélevés chez le patient par cytaphérèse ou directement par ponction de la moelle osseuse, et soient réinjectés après culture afin que ces cellules puissent reconstituer le système sanguin et immunitaire du patient (dans le cas d'une aplasie complète) ou compenser la période morbide de pancytopenie transitoire (phase de neutropénie, lymphopénie et thrombopénie) afin de permettre la reprise hématologique endogène de la victime aplasiée (dans le cas d'une irradiation accidentelle).

De même lors d'une insuffisance hépatique aiguë entraînant un risque vital à très brève échéance, il est nécessaire de pallier les fonctions hépatiques déficientes du patient par un traitement de détoxication sanguine extracorporelle nécessitant donc un grand nombre d'hépatocytes pour effectuer les fonctions métaboliques nécessaires. La chambre de culture ainsi que le bioréacteur décrits ci-dessus peuvent permettre la

- 33 -

5 production de cellules hépatiques en nombre suffisant pour obtenir un traitement efficace et une rapidité de détoxication compatibles avec les contraintes hémodynamiques que pose la circulation extracorporelle du sang du patient.

10 A titre illustratif, un bioréacteur d'un volume utile qui peut varier de 50 à 100 ml permet de réaliser une culture extracorporelle de cellules animales sur une période d'une dizaine de jours dans le cadre de la production d'une biomasse cellulaire à usage de greffe et/ou comme moyen palliatif d'une déficience. Dans le cadre de la reconstitution d'un modèle tissulaire organisé 15 et hiérarchisé, les durées de culture autorisées par le bioréacteur peuvent atteindre plusieurs mois.

20 Pour une greffe de cellules de type moelle osseuse (cellules hématopoïétiques), il est nécessaire que 10^6 à 10^7 de CFU (type de cellules immatures)/ Kg du poids du patient soient issues de la culture. Ce seuil clinique qui conditionne pour partie le succès de la greffe, permet d'estimer à 10^{10} le nombre de cellules issues de la culture hématopoïétique nécessaires à la greffe. La ou les chambres de culture ainsi que le bioréacteur tels que décrits peuvent être dimensionnés pour ce type 25 d'application.

30 Les conditions de pH, de température et de pression partielle en oxygène pour une culture des cellules mentionnées ci-dessus seront de l'ordre de 7,4 pour un pH de croissance, de l'ordre de 37,5 °C pour la température et une pression partielle en oxygène (en % de saturation) égale à 15 %. Le milieu nourricier est un milieu synthétique constitué de protéines ultra purifiées ou synthétisées et d'oligo-éléments (tels que le fer, le sélénium, la transferrine, des vitamines et autres) et 35 d'un colorant vital. Ce milieu nourricier est enrichi par des facteurs de croissance qui sont des cytokines dont la concentration peut varier de 10 à 100 ng/ml selon les besoins. De plus, les cytokines peuvent être stabilisées dans un état biologiquement actif avec la présence

- 34 -

d'héparanes. Le milieu nourricier de base -régénérant- est commercialisé sous les dénominations commerciales suivantes, il peut être du MEM-alpha ou du RPMI1640 ou encore du IMDM.

5

REVENDICATIONS

1. Chambre de culture pour la culture extracorporelle de cellules animales, délimitée par une enveloppe à axe de symétrie qui est formée d'une paroi latérale externe, de deux parois d'extrémités et d'entrées et de sorties de milieux liquides dynamiques, caractérisée en ce qu'elle comporte :
 - a) au moins deux membranes planes filtrantes (M1 et M3) à seuil de coupure différent, perpendiculaires à l'axe de symétrie ;
 - b) entre les membranes (M1 et M3) un moyen formant support de culture biocompatible permettant l'adhésion des cellules en état de culture ;
 - c) deux parois d'extrémités constituant des moyens de distribution des milieux liquides dynamiques ;
 - d) trois couples d'entrées et de sorties des milieux liquides dynamiques (F1, F2, F3), destinés à alimenter la chambre de culture des cellules et à extraire sélectivement les cellules cultivées, les déchets résultant de leur culture et les nutriments en excès, deux des couples étant pour chacun d'entre eux connectés entre l'une des parois d'extrémités et l'une des membranes, le troisième étant connecté entre les deux membranes planes filtrantes.
2. Chambre de culture selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'une des membranes planes filtrantes a un seuil de coupure compris entre 0,01 μm et 7 μm , et l'autre membrane plane filtrante a un seuil de coupure d'au plus 15 KiloDalton (KDa).
3. Chambre de culture selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'une des membranes planes filtrantes a un seuil de coupure préférentiellement compris entre 0,2 μm et 4 μm et

- 36 -

l'autre membrane plane filtrante a un seuil de coupure préférentiellement compris entre 10 et 12 KDa.

5 4. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les deux membranes à seuil de coupure différent sont distantes l'une de l'autre d'au plus 25 mm et préférentiellement entre 0,2 et 20 mm.

10 5. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le moyen formant support de culture biocompatible permettant l'adhésion des cellules en état de culture est un lit 15 de macrosupports biocompatibles.

20 6. Chambre de culture selon la revendication 5, caractérisée en ce que le lit de macrosupports a une épaisseur au plus égale à la distance entre les deux membranes filtrantes à seuil de coupure différent.

25 7. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 5 et 6, caractérisée en ce que les macrosupports présents entre les membranes ont une forme cylindrique, ou polyédrique ou sphérique.

30 8. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que la matière constitutive des macrosupports est choisie dans le groupe des matières minérales, des matières métalliques et des matières polymères biocompatibles.

35 9. Chambre de culture selon la revendication 8, caractérisée en ce que la matière constitutive des macrosupports est préférentiellement choisie dans le groupe constitué par le corail, le titane et ses alliages, les polyamides, les polymères fluorés.

- 37 -

10. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le moyen formant support de culture biocompatible permettant l'adhésion des cellules en état de culture est une membrane filtrante de culture M2 placée entre les deux membranes planes filtrantes M1 et M3 à seuil de coupure différent.
11. Chambre de culture selon la revendication 10, caractérisée en ce que la membrane filtrante de culture M2 repose sur la membrane à seuil de coupure d'au plus 15 Kda.
12. Chambre de culture selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisée en ce que la membrane filtrante de culture M2 est modifiée par greffage ou par cocultures de cellules.
13. Chambre de culture selon la revendication 12, caractérisée en ce que le greffage modificateur de la membrane filtrante de culture M2 concerne la fixation de ligands pour les molécules d'adhérence de types glycoprotéines, d'anticorps, de molécules protéiques.
14. Chambre de culture selon la revendication 12, caractérisée en ce que la modification par cocultures de cellules se fait par formation d'un substratum à partir d'un premier type cellulaire qui constitue la première culture de cellules adhérentes, suivie du rinçage dudit substratum et de la mise en place d'un deuxième type cellulaire, et optimisation des conditions de coculture.
15. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 10 à 14, caractérisée en ce que la membrane filtrante de culture M2 formant support de culture biocompatible a un seuil de coupure choisi dans l'intervalle allant de 0,01 µm à 7 µm.

- 38 -

16. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 4 et 10 à 15, caractérisée en ce que les membranes filtrantes M1 et M3 à seuil de coupure différent et la membrane filtrante de culture M2 sont soutenues par des supports à mailles.
5
17. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 16, caractérisée en ce que les faces internes des parois d'extrémités de l'enveloppe à axe de symétrie constituent des moyens de distribution des milieux liquides dynamiques.
10
18. Chambre de culture selon la revendication 17, caractérisée en ce que les faces internes des parois d'extrémité sont lisses.
15
19. Chambre de culture selon la revendication 17, caractérisée en ce que les faces internes des deux parois d'extrémités sont pourvues de stries de distribution des deux milieux liquides dynamiques F1 et F3.
20
20. Chambre de culture selon la revendication 19, caractérisée en ce que les stries de distribution des parois d'extrémités sont organisées en un réseau principal, ces stries étant préférentiellement divergentes dans le sens de propagation des milieux liquides dynamiques.
25
- 30 21. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 19 à 20, caractérisée en ce que les stries de distribution des parois d'extrémités sont complétées par un réseau secondaire formé de stries secondaires qui sont sensiblement perpendiculaires aux stries du réseau principal.
35
22. Chambre de culture selon l'une ou l'autre des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que les réseaux principal et secondaire constituent un réseau

- 39 -

quadrillé de propagation des milieux liquides dynamiques.

23. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que les stries du réseau principal et/ou du réseau secondaire des parois d'extrémités sont au contact des membranes à seuil de coupure différent.
- 10 24. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que les stries du réseau principal ont une profondeur d'au plus 5 mm, une largeur d'au plus 2 mm, et le pas compris entre deux stries adjacentes est d'au plus 15 2 mm.
- 20 25. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 19 à 23, caractérisée en ce que les stries du réseau secondaire ont une profondeur d'au plus 2 mm, une largeur d'au plus 2 mm.
- 25 26. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 25, caractérisée en ce que l'un des deux couples d'entrées et de sorties F1 des milieux liquides dynamiques est connecté entre une paroi d'extrémité et la membrane M1 à seuil de coupure compris entre 0,01 µm et 7 µm et alimente le milieu de culture des cellules, en un milieu nutritif comportant des facteurs de croissance par la traversée de ladite membrane plane filtrante à seuil de coupure compris entre 0,01 et 7 µm.
- 30 27. Chambre de culture selon la revendication 26, caractérisée en ce que le couple d'entrée et de sortie du milieu liquide dynamique F1 fonctionne en circuit fermé selon une boucle.
- 35 28. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 27, caractérisée en ce que le

- 40 -

couple d'entrée et de sortie du milieu liquide dynamique F2, connecté entre les deux membranes filtrantes, assume les fonctions d'introduction des cellules à cultiver et de récupération desdites cellules cultivées, de transfert de gènes et de récupération des cellules génétiquement modifiées, et d'introduction d'un liquide de rinçage et d'élimination des molécules inhibitrices du développement des cellules en culture.

10

29. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 28, caractérisée en ce que l'autre des deux couples d'entrées et de sorties du milieu liquide dynamique F3 est connecté en circuit ouvert au niveau de l'autre paroi d'extrémité et alimente, le milieu de culture des cellules en un milieu nutritif dépourvu de facteurs de croissance, par la traversée de la membrane plane filtrante à seuil de coupure d'au plus 15 KDa.

15

20

30. Chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 29, caractérisée en ce que les trois couples d'entrées et de sorties des milieux liquides dynamiques sont placés dans trois plans verticaux passant par l'axe de symétrie de l'enveloppe, ces plans étant décalés d'un angle d'environ 60° entre la première entrée et la deuxième entrée, et d'un angle d'environ 120° entre la première et la troisième entrée des milieux liquides dynamiques, les sorties desdits milieux liquides étant dans les mêmes dispositions angulaires.

25

30

35

31. Bioréacteur pour la culture extracorporelle de cellules animales comprenant une chambre de culture délimitée par une enveloppe à axe de symétrie formée d'une paroi latérale externe, de deux parois d'extrémités et d'entrées et de sorties de milieux liquides dynamiques et comprenant des moyens de

- 41 -

circulation desdits milieux dans ladite chambre, caractérisé en ce qu'il comporte :

- a) une chambre de culture desdites cellules comportant au moins deux membranes planes filtrantes M1 et M3 à seuil de coupure différent, perpendiculaires à l'axe de symétrie et qu'entre lesdites membranes à seuil de coupure différent se situe un moyen formant support de culture biocompatible favorisant l'adhésion des cellules en état de culture, ladite chambre étant délimitée par une enveloppe à axe de symétrie comprenant deux parois d'extrémités constituant des moyens de distribution des milieux liquides dynamiques et trois couples d'entrées et de sorties des milieux liquides dynamiques F1, F2, F3, destinés à alimenter la chambre de culture des cellules et à extraire sélectivement les cellules cultivées, les déchets résultant de leur culture et les nutriments en excès, dont deux des couples sont, pour chacun d'entre eux, connectés entre l'une des parois d'extrémités et l'une des membranes, le troisième étant connecté entre les deux membranes planes filtrantes ;
- b) des moyens de circulation du premier milieu liquide dynamique F1 selon un circuit en boucle fermée et un vase d'expansion R1 contenant ledit milieu, ces moyens étant reliés à ladite chambre de culture ;
- c) des moyens de circulation du deuxième milieu liquide dynamique F2 selon un circuit en boucle fermée ou en boucle ouverte suivant la fonction attribuée audit milieu et un réservoir R2 contenant ledit milieu, ces moyens étant reliés à ladite chambre de culture ;
- d) des moyens de circulation du troisième milieu liquide dynamique F3 selon un circuit en boucle ouverte et un réservoir R3 contenant ledit milieu,

- 42 -

ces moyens étant reliés à ladite chambre de culture ;

5 e) des moyens de contrôle, de régulation, et de conditionnement des milieux liquides dynamiques, reliés à un bloc de régulation-commande.

10 32. Bioréacteur selon la revendication 31, caractérisé en ce que les moyens de circulation desdits milieux liquides F1, F2 et F3 sont équipés respectivement des pompes P1, P2 et P3, reliées au bloc de régulation-commande.

15 33. Bioréacteur selon les revendications 31 et 32, caractérisé en ce que les moyens de circulation du troisième milieu liquide dynamique F3 sont équipés d'une vanne V3 reliée au bloc de régulation-commande.

20 34. Bioréacteur selon la revendication 31, caractérisé en ce que le vase d'expansion R1 contenant le milieu liquide dynamique F1 riche en facteurs de croissance est muni d'un filtre ayant un seuil de coupure de 0,22 µm et d'une électrovanne V1 commandée par le bloc de régulation-commande.

25 35. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 31 à 34, caractérisé en ce que le vase d'expansion R1 est muni de capteurs de niveau haut et de niveau bas de milieu liquide, qui servent à déclencher l'inversion de la circulation des fluides au sein de ladite chambre de culture.

30 36. Bioréacteur selon la revendication 31, caractérisé en ce que les moyens de conditionnement des milieux liquides dynamiques comportent des moyens de réglage en oxygène, en température et en pH desdits milieux.

35 37. Bioréacteur selon la revendication 36, caractérisé en ce que les moyens de conditionnement desdits milieux sont des modules unitaires fonctionnels, dimensionnés

- 43 -

pour une certaine valeur de transfert de masse ou d'énergie thermique.

38. Bioréacteur selon la revendication 37, caractérisé en 5 ce que les modules fonctionnels sont des aérateurs, des échangeurs thermiques, des régulateurs de pH, ou encore des modules de dialyse, d'ultrafiltration.
39. Bioréacteur selon les revendications 31 à 38, 10 caractérisé en ce qu'il comporte une chambre de culture selon l'une au moins des revendications 1 à 30.
40. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 15 31 à 39, caractérisé en ce que une pression p1 règne dans la zone C1 de la chambre de culture, située entre la paroi d'extrémité supérieure et la membrane plane filtrante à seuil de coupure compris entre 0,01 µm à 7 µm, de ladite chambre.
41. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 20 31 à 40, caractérisé en ce que une pression p2 règne dans la zone C2 de la chambre de culture comprise entre les deux membranes planes filtrantes à seuil de coupure différent de ladite chambre.
42. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 25 31 à 41, caractérisé en ce que une pression p3 règne dans la zone C3 de la chambre de culture, située entre la membrane plane filtrante à seuil de coupure d'au plus 15 KDa et la paroi d'extrémité inférieure de l'enveloppe de ladite chambre.
43. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 30 31 à 42, caractérisé en ce que le milieu nourricier riche en facteurs de croissance F1 est drainé de la zone C1 de la chambre de culture vers la zone C3 de ladite chambre de culture lorsque la pression p1 est

- 44 -

supérieure à la pression p3 et que la pression p2 est comprise entre p1 et p3 dans la chambre de culture.

44. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 31
5 à 42, caractérisé en ce que le milieu nourricier de base dépourvu en facteurs de croissance F3 est drainé de la zone C3 de la chambre de culture vers la zone C1 de ladite chambre de culture lorsque la pression p3 est supérieure à la pression p1 et que la pression p2 est comprise entre p1 et p3 dans la chambre de culture.

10

45. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 31 à 43, caractérisé en ce que l'ouverture de la pompe P1 permet l'alimentation de la chambre de culture en milieu nourricier F1 riche en facteurs de croissance, la pompe P3 étant à l'arrêt, et que la vanne V3 de contre pression est réglée de telle sorte que la pression p1 régnant dans la zone C1 de ladite chambre de culture est supérieure à la pression p3 régnant dans la zone C3 de ladite chambre, sachant que la pression p2 régnant dans la zone C2 est comprise entre les pressions p1 et p3.

15

20

25 46. Bioréacteur selon la revendication 45, caractérisé en ce que le bloc de régulation-commande programmé selon une séquence particulière inverse le sens de circulation des flux en arrêtant la pompe P1 et en mettant en marche la pompe P3 dès que le volume contenu dans le vase d'expansion R1 atteint un niveau bas.

30

35 47. Bioréacteur selon la revendication 45, caractérisé en ce que la vanne V3 est fermée.

48. Bioréacteur selon les revendications 46 et 47 caractérisé en ce que le milieu nourricier de base F3 dépourvu de facteurs de croissance permet la réalimentation de la chambre de culture où la

- 45 -

pression p3 dans la zone C3 de ladite chambre est supérieure à la pression p1 régnant dans la zone C1, sachant que la pression p2 régnant dans la zone C2 est comprise entre les pressions p1 et p3.

5

49. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 31 à 48, caractérisé en ce que les pompes P1 et P3 sont à l'arrêt lorsque la configuration d'entrée et de sortie de circulation du deuxième milieu liquide dynamique F2 est fixée en un circuit fermé ou ouvert selon la fonction qu'il lui est attribuée.
- 10 50. Bioréacteur selon la revendication 49, caractérisé en ce que le milieu liquide dynamique F2 sert à l'introduction dans la chambre de culture des cellules à cultiver et à la récupération des cellules après culture.
- 15 51. Bioréacteur selon la revendication 49, caractérisé en ce que le milieu liquide dynamique F2 sert à l'introduction de vecteur de transfert de gènes dans la chambre de culture contenant les cellules en culture et à la récupération des cellules cultivées, génétiquement modifiées.
- 20 25 52. Bioréacteur selon la revendication 49, caractérisé en ce que le milieu liquide dynamique F2 sert à l'introduction d'un liquide de rinçage des molécules inhibitrices du développement des cellules en culture et à l'élimination desdites molécules.
- 30 35 53. Bioréacteur selon la revendication 50, caractérisé en ce que pour l'inoculation dudit milieu F2 dans la zone C2 de la chambre de culture cellulaire au travers d'un septum biocompatible à l'aide d'une seringue, l'électrovanne V2E1 est ouverte, alors que les électrovannes V2E2, V2E3, V2S1, V2S2 et V2S3 sont fermées.

- 46 -

54. Bioréacteur selon la revendication 50, caractérisé en ce que pour la récupération des cellules après culture dans la chambre de culture, l'électrovanne V2S1 est ouverte, les électrovannes V2E2, V2E3, 5 V2S2, et V2S3 sont fermées et la pompe P2 est mise en route pour purger le contenu de la zone C2 dans la poche de collecte cellulaire.

10 55. Bioréacteur selon la revendication 52, caractérisé en ce que pour l'élimination des molécules inhibitrices lorsque le deuxième milieu F2 contient les éléments nécessaires au rinçage de l'espace de confinement cellulaire, lors de l'introduction dudit milieu l'électrovanne V2E3 est ouverte et les 15 électrovannes V2E1, V2E2 sont fermées.

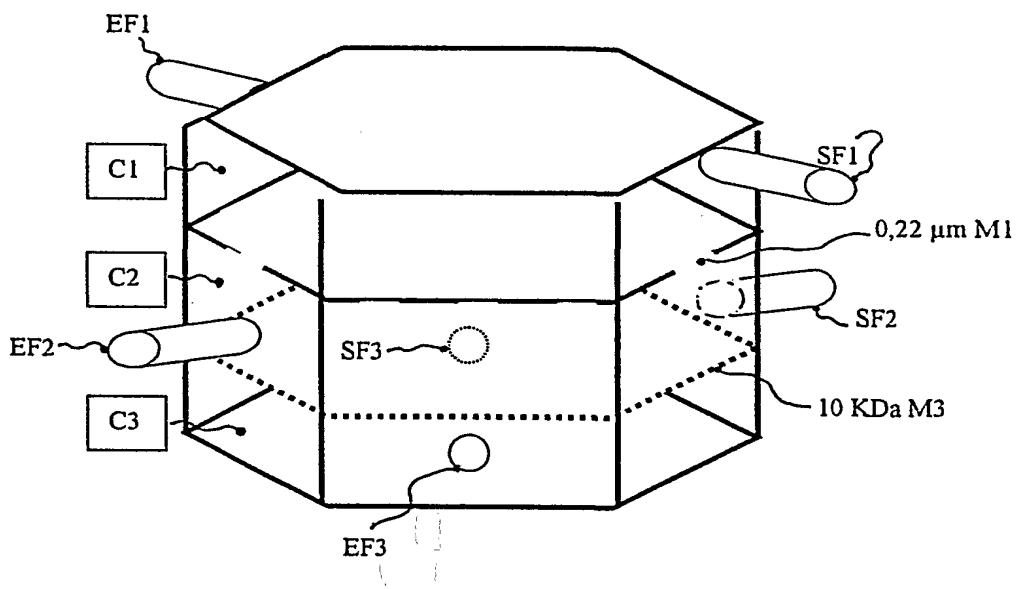
20 56. Bioréacteur selon la revendication 52, caractérisé en ce que ce deuxième milieu F2 de rinçage circule en continu en boucle ouverte et que lors de l'introduction et de la récupération dudit milieu de rinçage les électrovannes V2E1, V2E2, V2S1, V2S2 sont fermées, les électrovannes V2E3, V2S3 sont ouvertes.

25 57. Bioréacteur selon la revendication 51, caractérisé en ce que, pour l'inoculation des vecteurs de transfert génique contenu dans ledit milieu F2 circulant en circuit fermé dans la zone C2 de la chambre de culture cellulaire, l'électrovanne V2E2 est ouverte, alors que les électrovannes V2E1, V2E3, 30 V2S1, V2S3 sont fermées.

35 58. Bioréacteur selon l'une au moins des revendications 31 à 57, caractérisé en ce que le bloc de régulation-commande reçoit l'ensemble des informations relatives aux milieux liquides dynamiques F1, F2, F3, par les moyens de contrôle et de régulation, et les informations relatives aux divers réservoirs, pompes, vannes et pressions

- 47 -

régnant dans les zones C1, C2, C3 de la chambre de culture, les gère et émet les ordres de fonctionnement nécessaires.

FIGURE 1

2/5

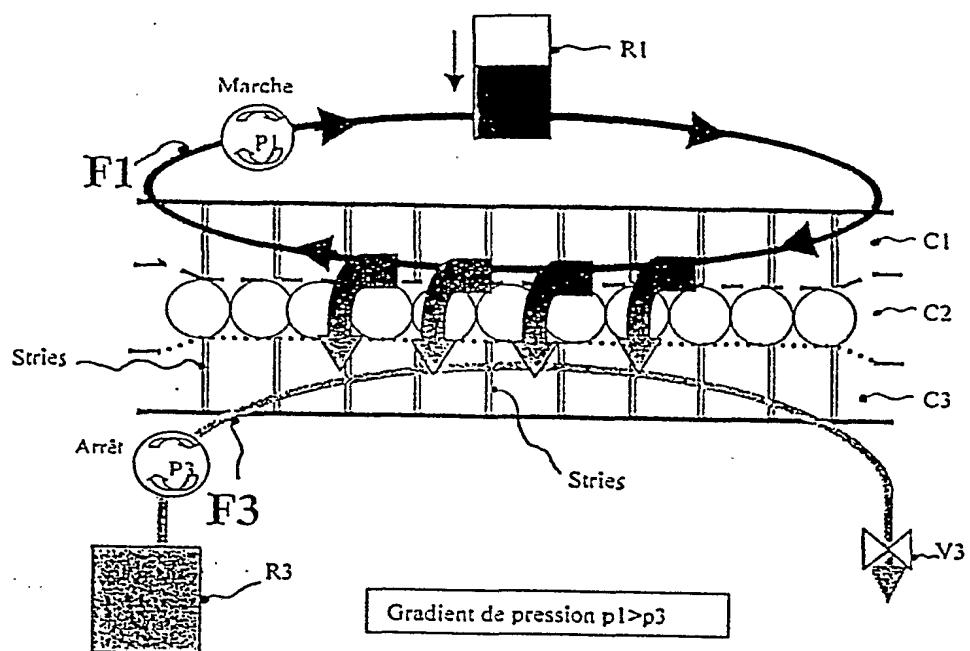
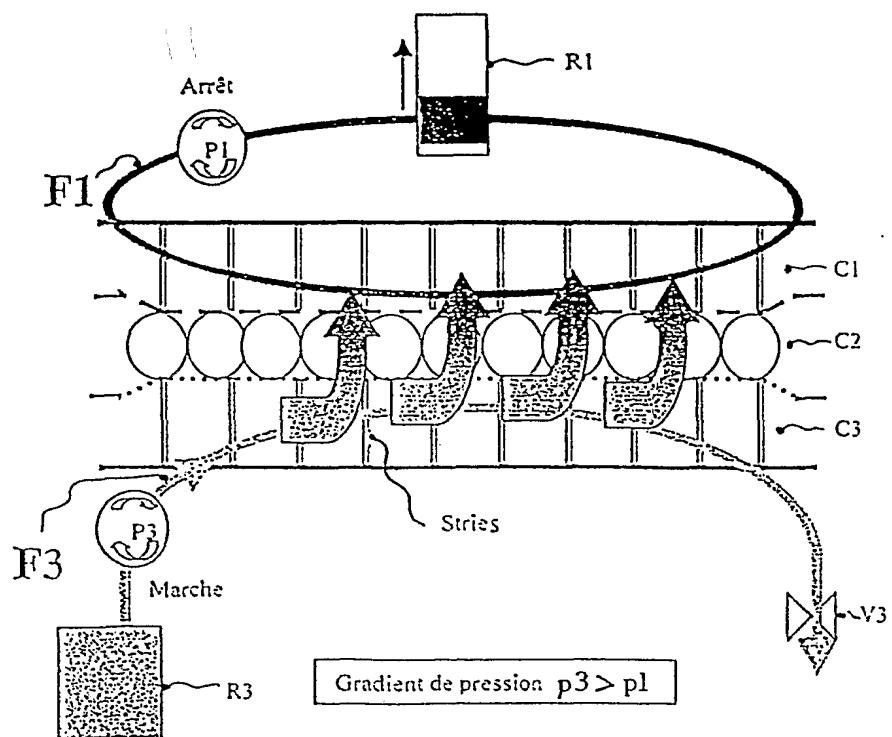
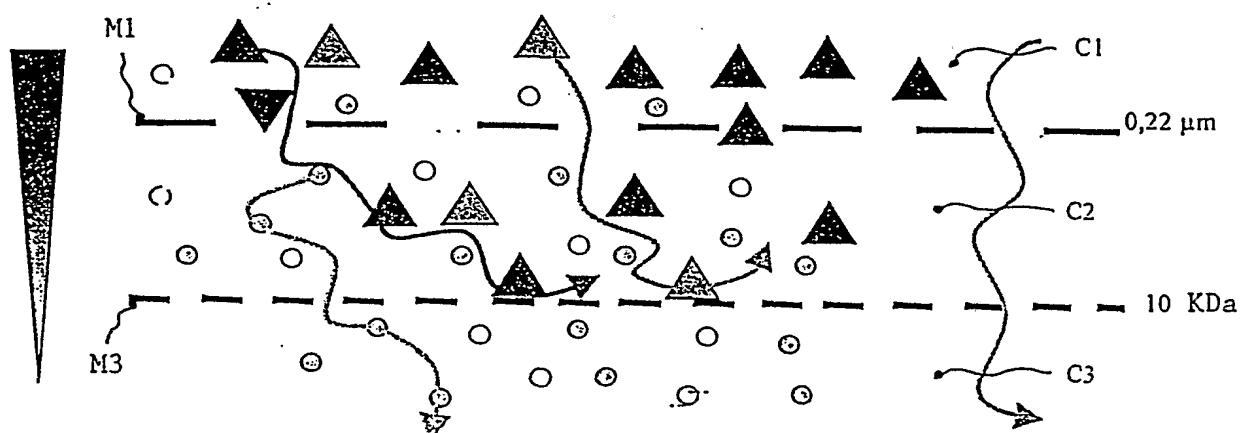
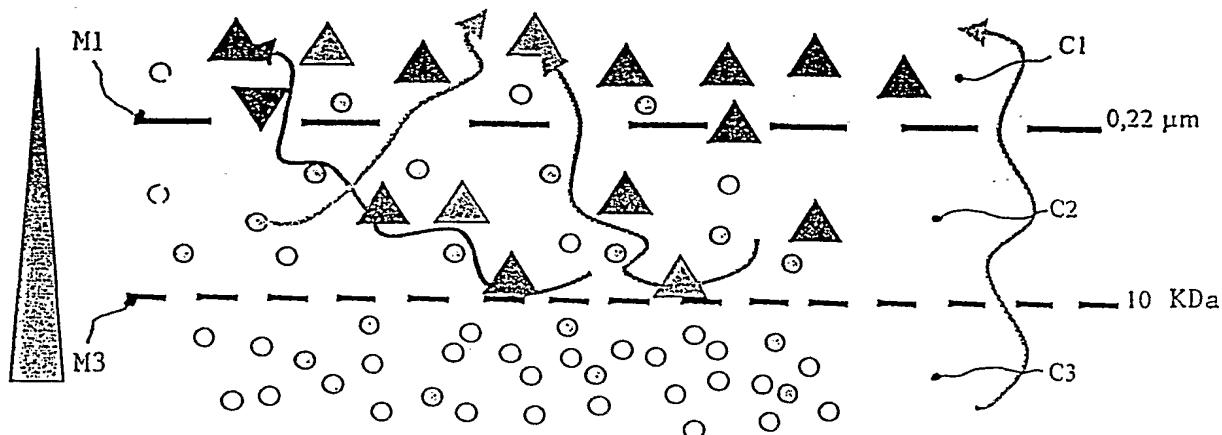
FIGURE 2FIGURE 3

FIGURE 4Gradient de pression $p_1 > p_3$ 

▲ Hormones de croissance ▲ Grosses protéines

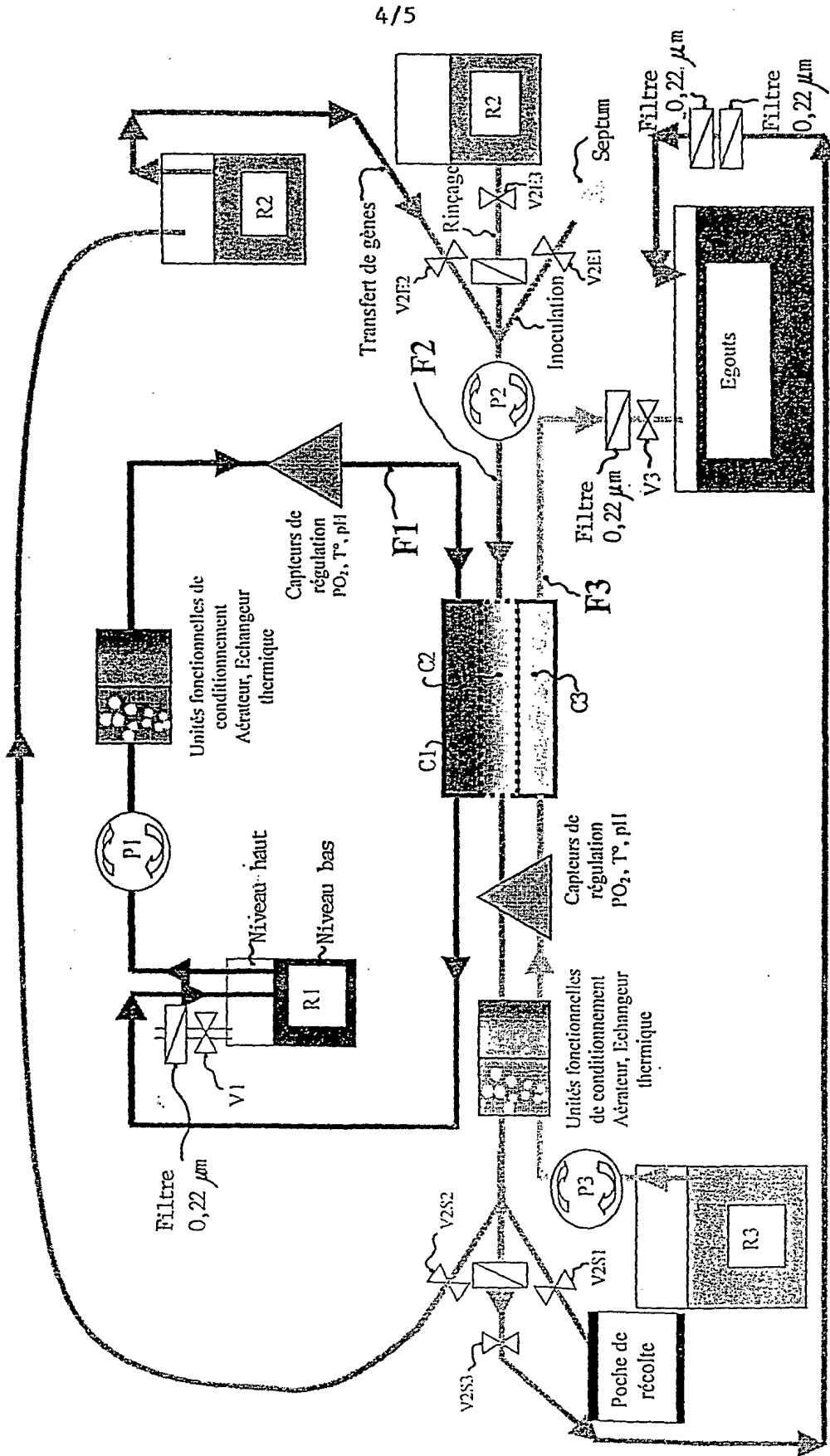
◎ Déchets (lactate, NO, NH4+) ○ Oligo éléments

FIGURE 5Gradient de pression $p_3 > p_1$ 

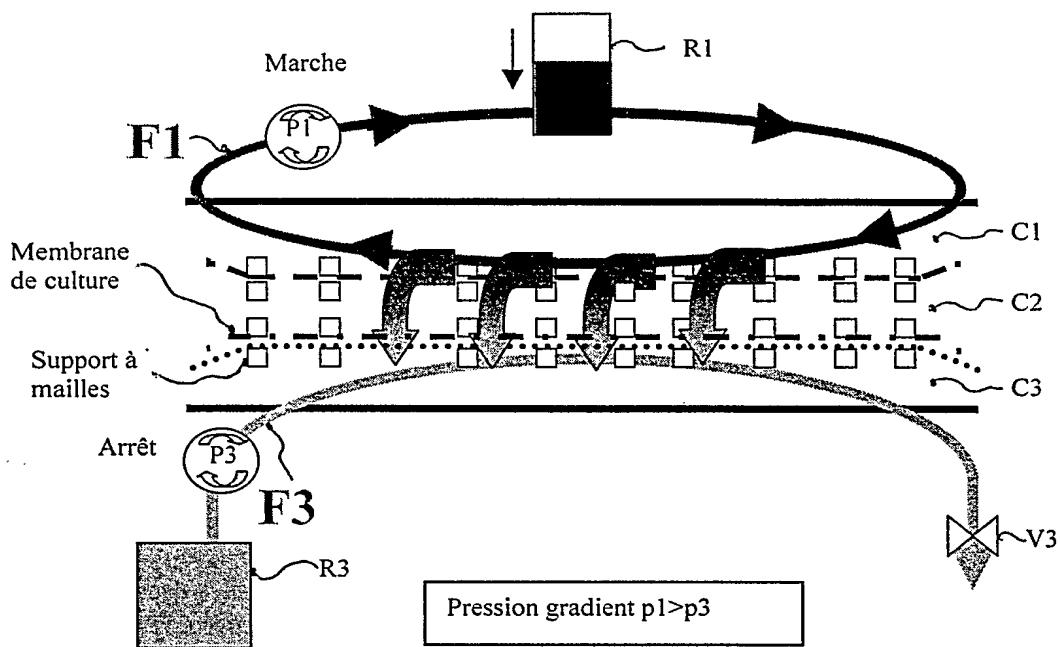
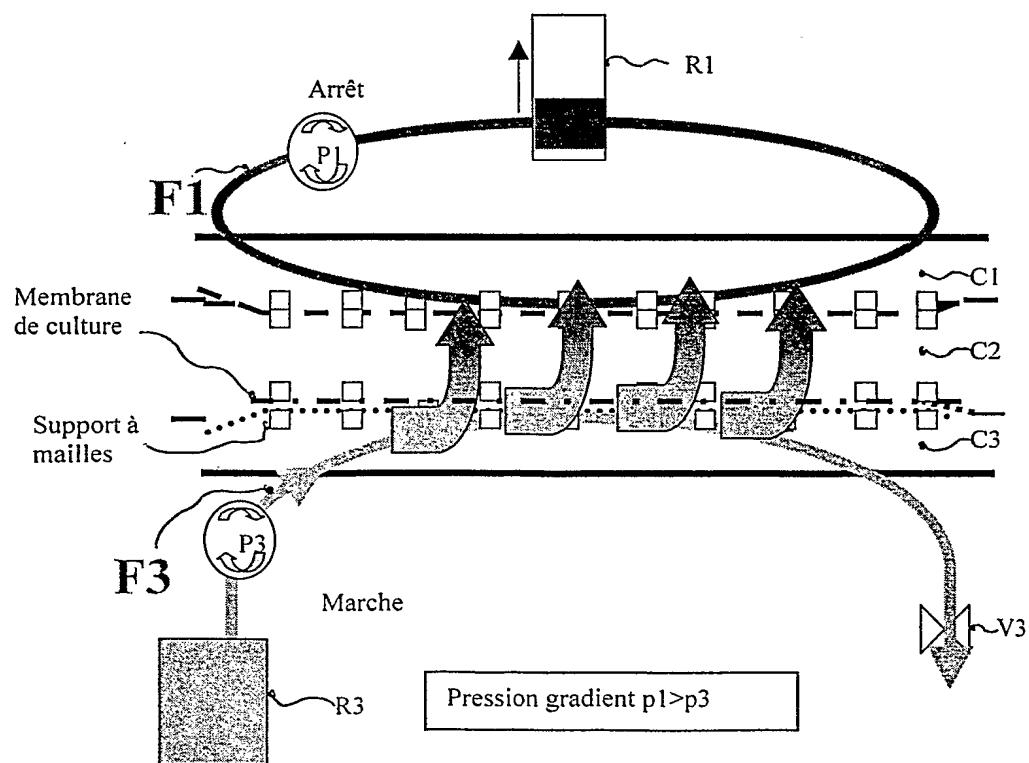
▲ Hormones de croissance ▲ Grosses protéines

◎ Déchets (lactate, NO, NH4+) ○ Oligo éléments

FIGURE 6



5/5

FIGURE 7FIGURE 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 01/02358A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12M3/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 155 237 A (MBR BIO REACTOR AG) 18 September 1985 (1985-09-18) claims; figures ---	1
A	US 5 605 835 A (CERRA FRANK B ET AL) 25 February 1997 (1997-02-25) ---	
A	WO 98 30308 A (KOPF HENRY B) 16 July 1998 (1998-07-16) figures 14,15 ---	1
A	WO 93 18133 A (BADER AUGUSTINUS) 16 September 1993 (1993-09-16) ---	
A	WO 90 01981 A (KOPF HENRY B) 8 March 1990 (1990-03-08) figure 7 ---	1
		-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

25 September 2001

04/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/02358

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 599 688 A (GRASS GEORGE M) 4 February 1997 (1997-02-04) claims; figures ----	1
A	EP 0 363 262 A (TERUMO CORP) 11 April 1990 (1990-04-11) claims; figures -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Appl. No.

PCT/FR 01/02358

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0155237	A 18-09-1985	DE 3409501 A1 AT 43633 T DE 3570693 D1 EP 0155237 A2 JP 60210982 A		24-10-1985 15-06-1989 06-07-1989 18-09-1985 23-10-1985
US 5605835	A 25-02-1997	US 5595909 A US 5981211 A AT 120485 T DE 68921974 D1 DE 68921974 T2 EP 0380610 A1 JP 2835629 B2 JP 3505965 T KR 131822 B1 WO 8911529 A1 AU 9031591 A WO 9207615 A1		21-01-1997 09-11-1999 15-04-1995 04-05-1995 03-08-1995 08-08-1990 14-12-1998 26-12-1991 11-04-1998 30-11-1989 26-05-1992 14-05-1992
WO 9830308	A 16-07-1998	US 5868930 A EP 0980285 A1 JP 2001507986 T WO 9830308 A1		09-02-1999 23-02-2000 19-06-2001 16-07-1998
WO 9318133	A 16-09-1993	DE 4206585 A1 AT 131867 T AU 668922 B2 AU 3745693 A CA 2129648 A1 DE 59301218 D1 DK 629237 T3 WO 9318133 A1 EP 0629237 A1 ES 2083851 T3 GR 3019255 T3 JP 3176628 B2 JP 7504325 T NO 943242 A US 5658797 A		09-09-1993 15-01-1996 23-05-1996 05-10-1993 16-09-1993 01-02-1996 09-04-1996 16-09-1993 21-12-1994 16-04-1996 30-06-1996 18-06-2001 18-05-1995 01-09-1994 19-08-1997
WO 9001981	A 08-03-1990	US 4882050 A US 5342517 A WO 9001981 A1 US 5049268 A US 5034124 A US 5232589 A		21-11-1989 30-08-1994 08-03-1990 17-09-1991 23-07-1991 03-08-1993
US 5599688	A 04-02-1997	NONE		
EP 0363262	A 11-04-1990	JP 2092270 A EP 0363262 A1		03-04-1990 11-04-1990

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No
PCT/FR 01/02358

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12M3/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12M

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 155 237 A (MBR BIO REACTOR AG) 18 septembre 1985 (1985-09-18) revendications; figures ----	1
A	US 5 605 835 A (CERRA FRANK B ET AL) 25 février 1997 (1997-02-25) ----	
A	WO 98 30308 A (KOPF HENRY B) 16 juillet 1998 (1998-07-16) figures 14,15 ----	1
A	WO 93 18133 A (BADER AUGUSTINUS) 16 septembre 1993 (1993-09-16) ----	
A	WO 90 01981 A (KOPF HENRY B) 8 mars 1990 (1990-03-08) figure 7 ----	1
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 septembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/10/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Coucke, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Internationale No
PCT/FR 01/02358

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 599 688 A (GRASS GEORGE M) 4 février 1997 (1997-02-04) revendications; figures -----	1
A	EP 0 363 262 A (TERUMO CORP) 11 avril 1990 (1990-04-11) revendications; figures -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Date Internationale No

PCT/FR 01/02358

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP 0155237	A	18-09-1985	DE AT DE EP JP	3409501 A1 43633 T 3570693 D1 0155237 A2 60210982 A		24-10-1985 15-06-1989 06-07-1989 18-09-1985 23-10-1985
US 5605835	A	25-02-1997	US US AT DE DE EP JP JP KR WO AU WO	5595909 A 5981211 A 120485 T 68921974 D1 68921974 T2 0380610 A1 2835629 B2 3505965 T 131822 B1 8911529 A1 9031591 A 9207615 A1		21-01-1997 09-11-1999 15-04-1995 04-05-1995 03-08-1995 08-08-1990 14-12-1998 26-12-1991 11-04-1998 30-11-1989 26-05-1992 14-05-1992
WO 9830308	A	16-07-1998	US EP JP WO	5868930 A 0980285 A1 2001507986 T 9830308 A1		09-02-1999 23-02-2000 19-06-2001 16-07-1998
WO 9318133	A	16-09-1993	DE AT AU AU CA DE DK WO EP ES GR JP JP NO US	4206585 A1 131867 T 668922 B2 3745693 A 2129648 A1 59301218 D1 629237 T3 9318133 A1 0629237 A1 2083851 T3 3019255 T3 3176628 B2 7504325 T 943242 A 5658797 A		09-09-1993 15-01-1996 23-05-1996 05-10-1993 16-09-1993 01-02-1996 09-04-1996 16-09-1993 21-12-1994 16-04-1996 30-06-1996 18-06-2001 18-05-1995 01-09-1994 19-08-1997
WO 9001981	A	08-03-1990	US US WO US US US	4882050 A 5342517 A 9001981 A1 5049268 A 5034124 A 5232589 A		21-11-1989 30-08-1994 08-03-1990 17-09-1991 23-07-1991 03-08-1993
US 5599688	A	04-02-1997		AUCUN		
EP 0363262	A	11-04-1990	JP EP	2092270 A 0363262 A1		03-04-1990 11-04-1990